

DESARROLLO Y MODIFICACIÓN DE BIOMATERIALES BASADOS EN POLI(3-HIDROXIALCANOATOS) PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS E INGENIERÍA TISULAR



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Dpto. de QUÍMICA FÍSICA APLICADA



**INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
POLÍMEROS (ICTP-CSIC)**
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)**

Memoria presentada por

José Manuel García García

Directores

Dra. Isabel Quijada Garrido

Dr. Leoncio Garrido Fernández

Madrid, 2012

ÍNDICE

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL.....1

I-1. INGENIERÍA TISULAR.....1

I-2. POLÍMEROS PARA INGENIERÍA TISULAR.....4

I-3. POLI(HIDROXIALCANOATOS).....5

I-3.1. Poli(3-hidroxiбутирато).....7

I-3.2. Poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуаlerato).....8

I-3.3. Poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуexanoato).....9

I-4. BIOCOMPATIBILIDAD.....11

I-5. BIODEGRADACIÓN.....12

I-6. BIBLIOGRAFÍA.....14

CAPÍTULO II

EMPLEO DE COPOLÍMEROS DE P3HB3HV PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO UROTELIAL.....17

II-1. INTRODUCCIÓN.....17

II-1.1. Reconstrucción del aparato urinario.....17

II-1.2. Uso de poliésteres biodegradables para la regeneración de tejido urotelial.....18

II-1.3. Modificación superficial de sustratos poliméricos para su aplicación en terapias regenerativas.....18

II-2. MATERIALES Y MÉTODOS.....20

II-2.1. Materiales.....20

II-2.2. Metodología experimental.....21

II-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....32

II-3.1. Identificación de las muestras.....32

II-3.2. Evaluación de la modificación superficial de los sustratos.....32

II-3.2.1. Medida del ángulo de contacto.....	33
II-3.2.2. Evaluación de la funcionalización superficial mediante ensayo de ninhidrina.....	36
II-3.2.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier mediante reflectancia total atenuada.....	37
II-3.2.4. Análisis elemental.....	42
II-3.2.5. Microscopía electrónica de barrido.....	44
II-3.2.6. Microscopía de fuerza atómica.....	45
II-3.2.7. Evaluación de las propiedades mecánicas de las películas mediante ensayo de esfuerzo-deformación.....	46
II-3.2.8. Viscosimetría.....	48
II-3.3. Evaluación de la unión covalente del fragmento peptídico de laminina YIGSR.....	49
II-3.4. Ensayos celulares de los sustratos de P3HB3HV modificados.....	51
II-3.5. Estudio de la morfología celular en función del tratamiento realizado a las películas de P3HB3HV.....	53
II-4. BIBLIOGRAFÍA.....	56

CAPÍTULO III

EMPLEO DE COPOLÍMEROS DE P3HB3HH_x PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO UROTELIAL.....57

III-1. INTRODUCCIÓN.....	57
III-1.1. POLI(3-HIDROXIBUTIRATO- <i>co</i> -3-HIDROXIHEXANOATO), UN POLIHIDROXIALCANOATO DE NUEVA GENERACIÓN.....	57
III-1.2. INTERACCIÓN DEL POLI(3-HIDROXIBUTIRATO- <i>co</i> -3-HIDROXIHEXANOATO) CON LA MATRIZ EXTRACELULAR Y SU CITOCOMPATIBILIDAD.....	58
III-1.3. ESTRATEGIAS PARA EL USO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO- <i>co</i> - 3-HIDROXIHEXANOATO) EN LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO UROTELIAL.....	58
III-1.4. USO DE SUSTRATOS TRIDIMENSIONALES EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDO.....	62
III-2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
III-2.1. MATERIALES.....	62
III-2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	64
III-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
III-3.A. SUSTRATOS BIDIMENSIONALES PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO UROTELIAL.....	80
III-3.A.1. Identificación de las muestras.....	81
III-3.A.2. Evaluación de la modificación superficial de los sustratos.....	81

III-3.A.2.1. Medida del ángulo de contacto.....	81
III-3.A.2.2. Evaluación de la funcionalización superficial mediante ensayo de ninhidrina.....	84
III-3.A.2.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier mediante reflectancia total atenuada.....	86
III-3.A.2.4. Microscopía electrónica de barrido.....	88
III-3.A.2.5. Evaluación de las propiedades mecánicas de las películas mediante ensayo de esfuerzo-deformación.....	91
III-3.A.3. Evaluación de la unión covalente del fragmento peptídico de laminina YIGSR.....	95
III-3.A.4. Ensayos celulares de los sustratos de P3HB3HHx modificados.....	96
III-3-B. ANDAMIOS TRIDIMENSIONALES PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO UROTELIAL.....	99
III-3.B.1. Identificación de las muestras.....	99
III-3.B.2. Caracterización físico-química de los andamios.....	99
III-3.B.2.1. Microscopía electrónica de barrido.....	99
III-3.B.2.2. Picnometría de helio y cálculo de la porosidad de los andamios.....	105
III-3.B.2.3. Porosimetría de intrusión de mercurio.....	107
III-3.B.2.4. Análisis termo mecanodinámico.....	110
III-3.B.2.5. Ensayo de ninhidrina.....	113
III-3.B.3. ENSAYOS CELULARES.....	115
III-3.B.3.1. Evaluación de la influencia del tipo de polímero	115
III-3.B.3.1.1. Microscopía de epifluorescencia.....	116
III-3.B.3.2. Evaluación del comportamiento celular en función de la funcionalización superficial.....	118
III-3.B.3.2.1. Microscopía de epifluorescencia.....	118
III-3.B.3.2.2. Ensayo de MTT	120
III-4. BIBLIOGRAFÍA.....	121

CAPÍTULO IV

BIOCOMPOSITES DE P3HAs PARA REGENERACIÓN ÓSEA.....123

IV-1. INTRODUCCIÓN.....123

IV-1.1. Uso de poli(hidroxialcanoatos) para la regeneración del tejido óseo.....123

IV-1.2. Vidrios bioactivos y su uso en terapias regenerativas del tejido óseo.....124

IV-1.3. Sulfatos de calcio en la ingeniería tisular ósea.....126

IV-2. MATERIALES Y MÉTODOS.....128

IV-2.1. Materiales.....128

IV-2.2. Metodología experimental.....	129
IV-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	134
IV-3.1. Identificación de las muestras.....	134
IV-3.2. Estudio de las propiedades térmicas de los biocomposites mediante calorimetría diferencial de barrido.....	134
IV-3.3. Observación de los composites mediante microscopía electrónica de barrido.....	142
IV-3.4. Estudio de las propiedades mecánicas de los biocomposites.....	146
IV-3.4.1. <i>Análisis termo mecanodinámico.....</i>	<i>147</i>
IV-3.4.2. <i>Ensayos de esfuerzo-deformación</i>	<i>150</i>
IV-3.5. Evaluación de la humectabilidad de la superficie de los biocomposites.....	154
IV-3.6. Estudio de la bioactividad <i>in vitro</i> de los biocomposites mediante inmersión en SBF.....	156
IV-4. BIBLIOGRAFÍA.....	162

CAPÍTULO V

COMPOSITES SEMICONDUCTORES PARA TERAPIAS REGENERATIVAS.....165

V-1. INTRODUCCIÓN.....	165
V-1.1. Composites semiconductores para aplicaciones biomédicas.....	165
V-1.1.1 <i>Composites semiconductores para regeneración del sistema nervioso central y periférico.....</i>	<i>166</i>
V-1.2. Empleo de nanotubos de carbono para la obtención de composites semiconductores.....	167
V-1.2.1. <i>Uso de nanotubos de carbono para aplicaciones biomédicas.....</i>	<i>168</i>
V-1.2.2. <i>Empleo de nanotubos de carbono en terapias regenerativas del sistema nervioso.....</i>	<i>169</i>
V-1.2.3. <i>Toxicidad de los nanotubos de carbono.....</i>	<i>170</i>
V-1.3. Aplicación de composites semiconductores de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) para la regeneración del sistema nervioso.....	171
V-2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	173
V-2.1. Materiales.....	173
V-2.2. Metodología experimental.....	174
V-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	188
V-3.1. Modificación estructural del copolímero P3HB3HHx.....	188

V-3.1.1. Degradación térmica del copolímero P3HB3HHx: obtención del polímero PHDN.....	188
V-3.1.2. Funcionalización con furfurilamina de los extremos ácidos del polímero PHDN: obtención de PHDNF.....	191
V-3.2. Evaluación de la modificación de los MWCNTs.....	193
V-3.2.1. Microscopía electrónica de transmisión.....	193
V-3.2.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.....	194
V-3.2.3. Espectroscopia raman.....	195
V-3.2.4. Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X.....	197
V-3.3. Caracterización físico-química de las propiedades de los composites semiconductores.....	200
V-3.3.1. Estudio de la distribución de los nanotubos de carbono en la matriz polimérica.....	201
V-3.3.1.1. Microscopía electrónica de barrido.....	201
V-3.3.1.2. Microscopía raman.....	207
V-3.3.2. Propiedades térmicas.....	207
V-3.3.2.1. Análisis termogravimétrico.....	207
V-3.3.2.2. Calorimetría diferencial de barrido.....	210
V-3.3.3. Propiedades superficiales.....	213
V-3.3.3.1. Microscopía de fuerza atómica.....	213
V-3.3.3.2. Medidas de ángulo de contacto.....	218
V-3.3.4. Propiedades mecánicas: ensayos de esfuerzo-deformación.....	220
V-3.3.5. Propiedades conductoras; medidas de conductividad eléctrica.....	224
V-3.4. Ensayos de citotoxicidad con neuronas.....	227
V-3.4.1. Observación de la morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido.....	228
V-3.4.2. Ensayo de viabilidad celular MTT.....	229
V-3.4.3. Observación celular mediante microscopía de fluorescencia.....	230
V-4. BIBLIOGRAFÍA.....	232
CAPÍTULO VI	
CONCLUSIONS/CONCLUSIONES.....	237

Tissue engineering has been defined as “*the application of principles and methods of engineering and life sciences toward fundamental understanding of structure-function relationships in normal and pathological tissues and the development of substitutes to restore, maintain, or improve tissue functions*”. To overcome this complex endeavour, tissue engineering has emerged as a multidisciplinary field of work including cell and molecular biology, materials science, polymer chemistry and clinical medicine, and it continues adding more diverse efforts since its beginnings over two decades ago.

Of special relevance in such innovative approach is the use of polymers due to their versatility as materials for the preparation of substrates for cell support and delivery of bioactive agents. Poly(3-hydroxyalkanoates) (P3HAs), polyesters produced by microorganisms under unbalanced growth conditions, are promising materials for biomedical applications and, in particular, for tissue engineering due to their natural occurrence, proven biocompatibility and tailorable bioabsorbability. Considering these facts, the main purpose of this Thesis was to assess the use of P3HAs for applications in soft and hard tissue engineering.

The present report is divided into six sections attending to the composition of polymer used and the application studied, with an introduction in Chapter I about the use of polymers in regenerative medicine.

The Chapter II and III describe the use of P3HAs for bladder repair. Chapter II addresses the problem of employ poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P3HB3HV) for generating urothelial tissue, obtaining promising results in fostering the growth of urothelial cells on the substrates.

Chapter III describes in detail the use of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (P3HB3HHx) for bladder repair or regeneration using bi- and tridimensional scaffolds, solving the problems associated to mechanical properties observed for P3HB3HV substrates, while maintaining the good results obtained on the interaction between cells and substrates.

The versatility of P3HAs is explored in Chapter IV, where P3HB3HV and P3HB3HHx are used to investigate their possibilities in tissue regeneration for bone

repair. Through the preparation of composites with Bioglass[®] and CaSO₄, the physico-chemical characteristics and *in vitro* bioactivity of the composites are analysed in detail.

In addition, it has been explored the possibility of using P3HB3HHx for nerve repair. The Chapter V describes de investigations of composites prepared with PHBHHx and varios types of carbon nanotubes (CNTs). The new semiconductive properties achieved for these substrates, as well as the physico-chemical properties, are analysed in detail in this chapter, studying also the citocompatiblity of the composite with fluorescence neurospheres.

The work performed has led to the conclusions summarized in Chapter VI.

La ingeniería de tejidos se ha definido como *“la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida al entendimiento fundamental de las relaciones función-estructura en tejidos sanos y enfermos, y al desarrollo de sustitutos para remplazar, mantener, o incrementar las funciones de un tejido”*. Para intentar resolver la complejidad que este planteamiento conlleva, la ingeniería de tejidos se ha convertido en un campo de estudio multidisciplinar, que incluye biología celular y molecular, ciencia de materiales, química de polímeros y medicina, y actualmente continua expandiendo la diversidad temática iniciada hace algo más de un par de décadas.

En este polifacético campo de estudio es especialmente relevante el uso de polímeros como sustratos debido, en parte, a su versatilidad. Los poli(3-hidroxialcanoatos) (P3HAs) son una familia de poliésteres producida por numerosos microorganismos, y representan un grupo de materiales prometedores en la reparación o regeneración de tejido, dado que provienen de fuentes naturales, son biocompatibles y es posible modificar su degradación *in vivo*. Teniendo en cuenta todos estos factores, el objetivo principal del presente trabajo de doctorando es el estudio de la aplicabilidad de los P3HAs en ingeniería tisular de tejidos duros y blandos.

La Memoria se divide en seis secciones, organizadas en función de la composición del polímero empleado y la aplicación estudiada, con una introducción en el Capítulo I sobre el uso de los polímeros en medicina regenerativa.

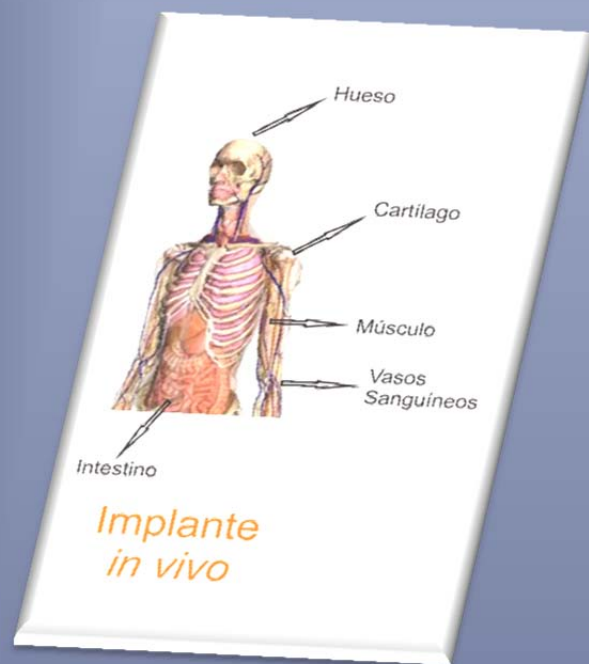
Los Capítulos II y III se centran en la aplicación de los P3HAs para la reparación de vejiga. El Capítulo II se estudia el problema del empleo del copolímero poli(3-hidroxibutirato-*co*-3hidroxivalerato) (P3HB3HV) en la preparación de tejido vesical, y se presentan los prometedores resultados obtenidos en la mejora del crecimiento de células uroteliales en estos sustratos.

El Capítulo III describe el uso de poli(3-hidroxibutirato-*co*- 3-hidroxihexanoato) (P3HB3HHx) para la reparación o regeneración de vejiga mediante sustratos bi- y tridimensionales, solventando el problema de las deficientes propiedades mecánicas del P3HB3HV para esta aplicación, y manteniendo los buenos resultados conseguidos en la interacción entre células y sustratos.

La versatilidad de comportamiento de los P3HAs se explora en el Capítulo IV, donde se describen las investigaciones de P3HB3HV y el P3HB3HHx en aplicaciones para la regeneración de tejido duro en la reparación de hueso. Mediante la obtención de composites, con Bioglass[®] y CaSO₄, se analizaron con detalle las propiedades químico-físicas y la bioactividad *in vitro* de los polímeros en los composites.

Además, se aborda el estudio de nuevas posibilidades del P3HB3HHx para la regeneración de tejidos. En particular, el Capítulo V de esta memoria describe la preparación de composites con distintos tipos de nanotubos de carbono, para ser empleados en la reparación de nervios. En este capítulo se analizan las nuevas propiedades semiconductoras de estos sustratos, así como sus propiedades químico-físicas, y la citocompatibilidad de los composites con neuroesferas fluorescentes.

Las principales conclusiones a las que ha conducido el trabajo de investigación se resumen en el Capítulo VI.



I-INTRODUCCIÓN GENERAL

Materiales poliméricos: nuevo impulso a la ingeniería tisular

I-1. INGENIERÍA TISULAR

Cada año millones de personas sufren pérdida de órganos y tejidos. Las soluciones médicas usuales recurren al trasplante de los tejidos u órganos dañados, realizando reconstrucciones quirúrgicas o usando dispositivos mecánicos extracorpóreos como en la diálisis renal. A pesar de que estas soluciones han salvado numerosas vidas, suelen ser soluciones imperfectas e insuficientes, especialmente por ser temporales. Entre las razones más importantes de esa escasez se incluyen: (1) la cantidad limitada de tejido propio y (2) la posibilidad de reacciones inmunológicas e infecciones asociadas con los tejidos donados.

Para superar el problema de la escasez de tejido vivo y órganos disponibles para trasplantes o solventar las dificultades intrínsecas de esta práctica, la ingeniería tisular ha emergido en los últimos años como una prometedora aproximación para la reparación y regeneración de tejidos u órganos dañados, como consecuencia de un trauma, lesión, enfermedad o envejecimiento.^{1,2}

La ingeniería tisular es un campo que aplica los principios de la biología, la medicina y la ingeniería para desarrollar sustitutos funcionales de los tejidos que se proponen reparar o regenerar.¹ Este campo de investigación integra un trabajo interdisciplinar que incluye la ciencia de polímeros y materiales, biología celular y molecular y medicina clínica.³ En la aproximación más usual, un biomaterial con una estructura bien definida sirve como soporte temporal para las células y dirige su proliferación y/o diferenciación para formar el tejido u órgano deseado. Factores de crecimiento y otras biomoléculas pueden ser incorporadas al sustrato sintético desarrollado, junto con células pluripotenciales o diferenciadas procedentes del mismo paciente o de otra fuente,⁴ con el propósito de guiar la regulación de las funciones celulares durante la regeneración del tejido o el órgano.⁵⁻⁷

Dentro del gran crecimiento producido durante el último cuarto de siglo en el campo de la ingeniería tisular, tres han sido las estrategias principales adoptadas para la preparación de nuevos tejidos (Figura I-1): i) empleo directo de células, ii) utilización de biomateriales sin cultivo celular o iii) empleo de biomateriales en el que se han sembrado células.

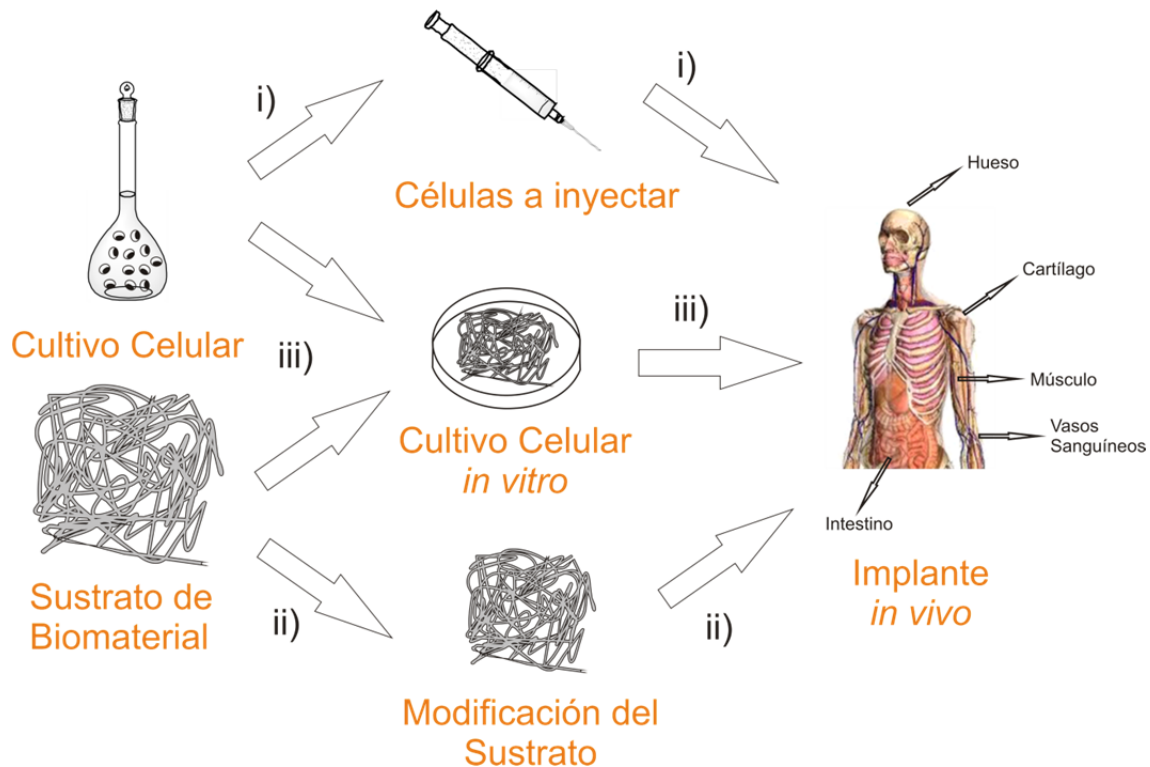


Figura I-1: Estrategia completa en ingeniería tisular mediante el método de i) empleo de células, ii) biomateriales sin cultivo celular y iii) biomateriales con cultivo celular.

En la actualidad la estrategia más empleada y prometedora es la del uso de sustratos o andamios, sembrados con células, cuyas dimensiones estructurales definen la geometría del tejido a reemplazar y cuyas características (físicas, químicas...) promuevan las condiciones ambientales para promocionar la regeneración del tejido.

A pesar de que los requerimientos de un material destinado a ser utilizado en ingeniería tisular son muy variados y específicos de acuerdo con la estructura y función del tejido de interés,⁸ existen dos características que se consideran indispensables o deseables:⁹

- i) *Biocompatibilidad*. Los materiales deben ser no tóxicos en las condiciones de uso en el organismo y facilitar la adhesión y proliferación celular.
- ii) *Biodegradabilidad*. Idealmente, la degradación del material debe originar productos o intermedios no tóxicos que puedan ser reabsorbidos o excretados fácilmente por el cuerpo. Al mismo tiempo, la degradación del material y la regeneración del nuevo tejido deberían ocurrir de forma paralela y complementaria

El sustrato debe proporcionar también cierto nivel de soporte físico a partir del momento de la implantación, para suplir la función del tejido mientras la nueva matriz se va depositando.¹⁰⁻¹³ En muchos casos, las demandas físicas de los materiales para andamios son complicadas debido a la anisotropía inherente en la mayoría de tejidos vivos. Sin embargo, las soluciones ingenieriles no necesariamente tienen que ser costosas o complicadas.

Más allá de sus roles estructurales o biomecánicos, las propiedades físicas (tales como la topografía y la tridimensionalidad) también influyen en muchos aspectos del comportamiento celular,¹⁴⁻¹⁶ orientando las células por ejemplo, contribuyendo potencialmente a la función física del tejido,¹⁷ o produciendo la diferenciación celular hacia células tan diversas como nerviosas u óseas.^{18,19}

De modo similar, una corriente emergente en TE es que, antes que intentar recrear la enorme complejidad de los tejidos vivos *ex vivo*, deberíamos centrarnos en el desarrollo de materiales sintéticos que establezcan interacciones clave con las células, a fin de desbloquear el poder innato del cuerpo humano de organización y autoreparación.²⁰

En algunos casos funciones específicas para biopolímeros pueden ser atribuidas a pequeños dominios funcionales que serían empleados en lugar de la proteína completa.^{21,22} El más estudiado de estos segmentos es el ácido de arginina-glicina-aspartato (RGD) que actúa como unión de la integrina, y que se encuentra en numerosas proteínas de la ECM, incluidas, fibronectina, laminina, colágeno tipo IV, tenascina y trombospodina.²³⁻²⁵

Estudios recientes se han centrado también en el uso de una química más básica para influir en el desarrollo celular, pavimentando el camino para biomateriales estructuralmente sencillos, pero que orienten el crecimiento celular. Por ejemplo, en ausencia de péptidos de adhesión en la superficie de los sustratos, las células interactúan con los andamios por medio de sus proteínas, y en esta relación la topografía y la hidrofiliidad son consideraciones fundamentales. En superficies poliméricas hidrofílicas, por ejemplo, las proteínas celulares mantienen de modo más efectivo su configuración original.²⁶ Siguiendo estos planteamientos básicos, la eficiencia de tratamientos químicos sencillos se ha puesto de manifiesto en un estudio

donde la introducción de distintos grupos funcionales en la superficie cambió la conformación de la fibronectina adsorbida dando lugar a una alteración en el proceso de unión de la integrina.²⁷ De este modo los índices de diferenciación de los osteoblastos se incrementaron considerablemente en superficies funcionalizadas con –OH y –NH₂, en comparación con los grupos CH₃ y COOH. Hay un interés creciente en el uso de esta química simple para incrementar las respuestas celulares en favor de una aplicación particular.

La ambición de los primeros momentos del desarrollo de la ingeniería tisular y las aplicaciones biomédicas de reconstruir órganos enteros, ha dado paso a objetivos más pequeños y accesibles. Los PHAs son materiales idóneos para este planteamiento. De este modo, en la presente Memoria se ha estudiado el desarrollo de aplicaciones específicas para distintos tipos de P3HAs. Las distintas composiciones copoliméricas de los polímeros empleados permitirán la elección del mejor sustrato en función de los requerimientos físicos y mecánicos, aprovechando la variación de las propiedades de los materiales empleados. A partir de modificaciones químicas sencillas, pero dirigidas, se busca el incremento de la interacción con las células y matrices extracelulares, aumentándose dicha interacción mediante la unión química de fragmentos peptídicos adecuados, en algunos casos. La biocompatibilidad y biodegradabilidad de los P3HAs es especialmente interesante, lo que permite que se haya estudiado su uso como matrices en la formación de composites con composiciones dirigidas para el crecimiento óseo o neuronal.

I-2. POLÍMEROS PARA INGENIERÍA TISULAR

Los polímeros juegan un papel esencial en la ingeniería de tejidos. Para cumplir con las diversas necesidades en este campo de trabajo, varios polímeros han sido investigados para esta aplicación, así como copolímeros, mezclas de polímeros, o composites poliméricos.

Los polímeros sintéticos representan el mayor grupo de polímeros biodegradables, lo que ha permitido que sean empleados para una gran cantidad de usos médicos, ya que es posible regular la velocidad de degradación de los mismos. Polímeros biodegradables derivados de poliésteres alifáticos sintéticos, tales como

poli(glicólico) (PGA), poli(D,L-láctico) (PDLLA), poli(L-láctico) (PLLA), y sus copolímeros, son ampliamente usados como biomateriales en prácticas quirúrgicas.^{28,29}

A pesar de sus usos presentes y futuros, estos polímeros biodegradables presentan un serio inconveniente que debe ser tenido muy en cuenta para su aplicación, que es el riesgo de toxicidad e inmunogenicidad consecuencia de la alta acidez de sus productos de degradación.

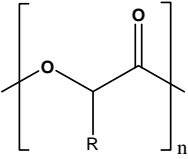
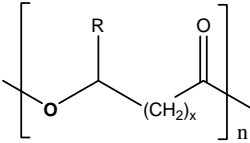
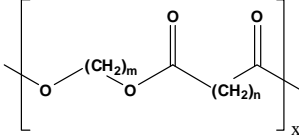
Biomateriales como polisacáridos o proteínas también se han empleado para aplicaciones biomédicas dada su falta de toxicidad o respuestas inflamatorias cuando se comparan con los polímeros sintéticos. Sin embargo, la escasa resistencia mecánica de estos biomateriales para determinadas aplicaciones,³⁰ y a pesar de que este tipo de polímeros naturales son empleados para aplicaciones biomédicas en las que no se requieren propiedades mecánicas (aplicaciones cardiovasculares y cesión controlada de fármacos, entre otras), la necesidad del empleo de materiales con propiedades mecánicas adecuadas, biodegradabilidad y biocompatibilidad, se ha incrementado notablemente en los últimos años. En este sentido, el uso de poli(hidroxialcanoatos) puede suplir la mayoría de las propiedades requeridas para ingeniería tisular, incluidas las propiedades mecánicas adaptadas a cada aplicación.

I-3. POLI(HIDROXIALCANOATOS)

En ingeniería tisular, uno de los principales grupos de polímeros de origen natural empleado, es el de los poliésteres alifáticos. La Tabla I-1 muestra, a modo de ejemplo, las estructuras de los principales tipos de poliésteres alifáticos, así como la denominación de algunos de los miembros más representativos de esta familia.

Dentro de la familia de los poliésteres alifáticos, los poli(hidroxialcanoatos) es uno de los grupos de polímeros más representativos que es sintetizado por una gran cantidad de bacterias y microorganismos. Estos polímeros son empleados por los microorganismos como reserva de carbono y energía³¹ bajo determinadas condiciones de exceso en el aporte de carbono y limitación de la cantidad de nutrientes (amonio, sulfato, y fosfato).^{32,33}

Tabla I-1. Estructuras de los poliésteres alifáticos más representativos y ejemplos de los más relevantes de ellos.

Poliéster	Estructura Química	Ejemplos
Poli(hidroxiácido)		Ácido poli(glicólico) PGA R = H Ácido poli(L-láctico) PLLA R = CH ₃
Poli(hidroxiálcanoato)		Poli(3-hidroxiбутирато) (P3HB) x = 1; R = CH ₃ Poli(caprolactona) (PCL) x = 5 ; R = H
Poli(alquen dicarboxilato)		Poli(etilen succinato) (PES) n = 2 Poli(butilen succinato) (PBS) n = 4

Los miembros del grupo de los PHAs pueden existir como homopolímeros o como copolímeros de dos o más ácidos hidroxiálcanóicos. La composición del PHA se puede variar y puede ser controlada mediante la cantidad de carbono usada en la síntesis, y cambiando las condiciones de crecimiento de los microorganismos encargados de las síntesis.³⁴

Las propiedades de los diferentes PHAs son consecuencia, principalmente, del tipo y número de unidades monoméricas y su distribución, así como de los sustituyentes de la cadena principal y de la separación entre los grupos éster que la forman. Para el caso de los poli(3-hidroxiálcanoatos) (P3HAs), por ejemplo, con una separación entre los grupos éster constante, la variación de propiedades es función de la longitud de cadena de los sustituyentes laterales.

Los PHAs son generalmente biodegradables y biocompatibles, haciendo de ellos unos candidatos ideales para su uso como biomateriales para ingeniería de tejidos.³⁵ Todas estas características han hecho que durante las últimas dos décadas, los

biopoliésteres del grupo de los PHAs hayan emergido como prometedores materiales para una amplia variedad de aplicaciones médicas.^{36,37}

Dependiendo de las propiedades requeridas para cada aplicación, los PHAs pueden ser mezclados, modificados superficialmente o se pueden realizar composites con otros polímeros, e incluso con partículas inorgánicas para posteriormente ajustar sus propiedades mecánicas y biocompatibilidad. Las numerosas posibilidades de preparar “*a medida*” los PHAs para aplicaciones médicas han demostrado que esta clase de materiales poseen un gran futuro como materiales para ingeniería tisular.

I-3.1. POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

El P3HB (Figura I-2) es el miembro más simple y común de la familia de los PHAs. Fue descubierto en la *Bacillus megaterium* por el científico francés Lemoigne en 1926, aunque su evaluación comercial no empezó hasta finales de los años 50. Lemoigne informó de que esta bacteria acumulaba intracelularmente un monómero que consistía en ácidos 3-hidroxibutíricos que se unían a través de grupos éster entre el grupo 3-hidroxilo y el grupo carboxílico del siguiente monómero. Lemoigne demostró que se trataba de poliésteres de alto peso molecular, años antes de que Carothers presentara su pionero trabajo sobre poliésteres sintéticos en 1946.

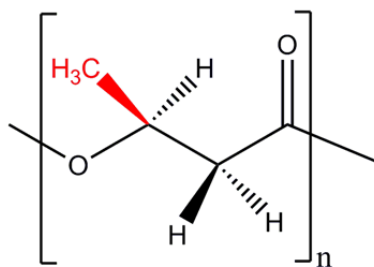


Figura I-2: Estructura química del poli(3-hidroxibutirato).

A pesar de que el primer PHA, el P3HB, se describió en fechas tan tempranas como 1926, no fue hasta 1983 cuando se informó por primera vez de PHAs con cadenas laterales más largas. En la década de los ochenta, coincidiendo con la aparición de los PHAs con cadenas laterales de más de un átomo de carbono, se desarrolló la primera aplicación biomédica del P3HB, cuando Korsatko y colaboradores utilizaron tabletas de P3HB para cesión controlada de fármacos.³⁸⁻⁴⁰ Desde ese momento se produjo la aparición de un número creciente de investigaciones sobre el potencial clínico del

P3HB, incluyendo su uso como implantes para reparación ósea, tubos para anastomosis y filmes de separación, así como parches cardiovasculares. Conductos de P3HB se han usado para reparar nervios periféricos⁴¹⁻⁴³ y la médula espinal,⁴⁴ y parches de este polímero se han desarrollado para cubrir tejido dañado del tracto gastrointestinal⁴⁵ o la duramadre dañada.⁴⁶ A modo de resumen, el P3HB puede ser considerado como un polímero con un gran potencial como material degradable para implantes.

A pesar de que el P3HB posee propiedades mecánicas comparables a otros poliésteres biodegradables sintéticos, posee una serie de desventajas: marcada fragilidad, muy baja deformación, alta susceptibilidad a una rápida degradación térmica, dificultad de procesamiento mediante tecnologías convencionales para termoplásticos, y su alto precio en comparación con otros plásticos.⁴⁷

La relativa alta cristalinidad del P3HB de origen natural, es una desventaja en aplicaciones de ingeniería tisular, pero se puede superar mediante la copolimerización e incorporación de otros monómeros de PHA, tales como 3-hidroxivalerato, 4-hidroxibutirato (4HB), o 3-hidroxihexanoato.

I-3.2. POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-*CO*-3-HIDROXIVALERATO)

Mediante la adición de ácido propiónico al medio de obtención del P3HB, es posible obtener el copolímero con 3-hidroxivalerato, el poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato). El ratio de los copolímeros en el P3HB3HV depende de la cantidad de ácido propiónico añadida al medio de obtención. La figura I-3 muestra la estructura del P3HB3HV:

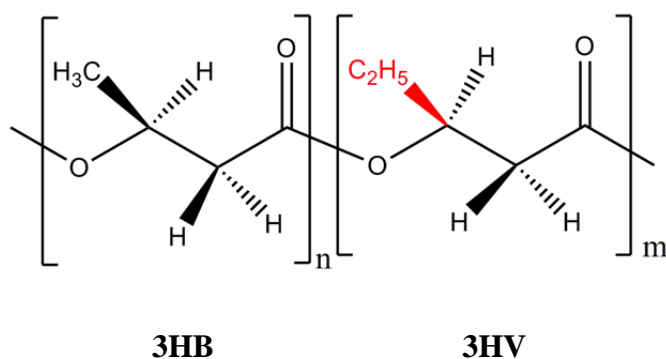


Figura I-3. Estructura del poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato).

El incremento de la cantidad de 3HV influye en las propiedades del P3HB3HV,⁴⁸ tal y como se muestra en la Tabla I-2. La copolimerización permite disminuir la cristalinidad del P3HB ya que la introducción de unidades de hidroxivalerato (HV) tiene como consecuencia la disminución de la estereorregularidad, aumentando los segmentos amorfos. Sin embargo, la cristalinidad de los copolímeros de P3HB3HV es superior a lo esperado en todo el rango de composiciones debido al isodimorfismo, esto es, la cocrystalización de las dos unidades monoméricas en la misma lámina cristalina.^{49,50}

Tabla I-2: Propiedades térmicas y mecánicas de películas de P3HB y P3HB3HV obtenidas por el método de colada.

Polímero	T_m (°C)	T_g (°C)	X_c (%)	ϵ_R (%)	E (GPa)	σ_R (MPa)
P3HB	175	9	73 ⁵⁰	4	3.8	45
P3HB-3%HV	170	-	-	-	2.9	38
P3HB-12%HV ³⁴	154	4	59	5	0.5	38
P3HB-20%HV	114	-5	54 ⁵⁰	27	1.9	26
P3HB-24%HV ³⁴	129	-6	55	5.4	0.4	23
P3HB-34%HV	92	-9	52 ⁵⁰	970	1.2	18
P3HB-55%HV	83	-	60 ⁵⁰	-	-	-
P3HB-71%HV	83	-13	64 ⁵⁰	-	-	-
P3HB-95%HV	106	-	68 ⁵⁰	-	-	-

Tal y como se observa en la Tabla I-2, la variación composicional introduce cambios en el comportamiento del polímero, y esta variabilidad permite la elección de una composición en función de las propiedades deseadas para una aplicación determinada.

Uno de los inconvenientes asociados al P3HB3HV es el proceso de envejecimiento, que afecta a sus propiedades mecánicas, volviéndolo frágil, rígido y quebradizo a las pocas horas de estar a temperatura ambiente. La mayoría de los autores lo han atribuido a fenómenos de recrystalización, que restringen la movilidad de las cadenas amorfas.

I-3.3. POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-*CO*-3-HIDROXIHEXANOATO)

El poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxihexanoato) (P3HB3HHx) (Figura I-4) es un poliéster termoplástico que se acumula en especies de *Aeromonas* y cuyo

descubrimiento se remonta a 1993, cuando Shiotani y Kabayashi patentaron en Japón el procedimiento de obtención de este polímero a partir de aceite de oliva.⁵¹

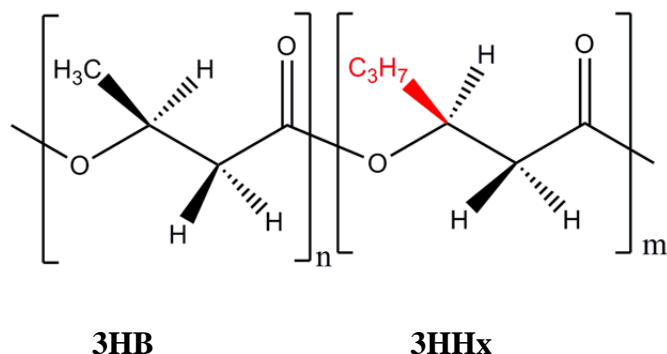


Figura I-4: Estructura del poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxihaxanoato).

El P3HB3HHx muestra una variación de sus propiedades con respecto al P3HB mayor que la observada para el P3HB3HV, debido a que las unidades monoméricas del 3HHx no encajan en la red cristalina del 3HB.⁵¹ Este hecho evita el fenómeno de isodimorfismo observado para el caso del copolímero con 3HV.

Las propiedades mecánicas del P3HB3HHx se caracterizan por un bajo módulo elástico, una alta elongación a rotura y valores relativamente bajos de resistencia a la rotura. Los valores de varios copolímeros de 3HHx se muestran en la Tabla I-3.

Tabla I-3: Propiedades térmicas y mecánicas de películas de P3HB y P3HB3HHx obtenidas por el método de colada.

Polímero	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_g (°C)	X_c (%)	ϵ_R (%)	E (MPa)	σ_R (MPa)
P3HB	175	-	9	73.0	4	3800.0	45.0
P3HB-5% HHx ⁵²	135	148	-5.3	41.6	163.6	-	12.8
P3HB-7% HHx ⁵²	136	144	-5.0	39.9	381.4	-	15.3
P3HB-10% HHx ⁵²	127	151	-6.4	30.1	496.9	202.9	14.9
P3HB-12% HHx ⁵²	135	146	-6.9	30.7	579.5	-	20.1
P3HB-14% HHx	90.7	100	-3.2	26.0	760	221.7	23.0
P3HB-18% HHx ⁵²	130	142	-8.1	25.1	660.5	-	12.7

A diferencia de lo que ocurre con el P3HB y el P3HB3HV, donde la cristalización secundaria reduce el número de cadenas poliméricas en la fase amorfa, en el P3HB3HHx presenta una cristalización secundaria mínima, debido a la mayor longitud de la cadena lateral del monómero de 3HHx. La inhibición de la cristalización secundaria (para composiciones superiores al 7% molar en 3HHx) da como resultado la

inexistencia de un marcado envejecimiento, manteniéndose las propiedades mecánicas del polímero durante al menos 60 días a temperatura ambiente.⁵² El almacenamiento del polímero a temperaturas inferiores a su T_g (< -10 °C), reduce la movilidad de las cadenas, ralentizando la posible cristalización secundaria y evitando el envejecimiento del polímero durante periodos de tiempo más largos.

La introducción de las unidades monoméricas de 3HHx produce una variación en la cristalinidad, tal y como es de esperar, a consecuencia de la introducción de un monómero amorfo en una estructura cristalina diferente, como es la del P3HB. La influencia está directamente relacionada con la cantidad de 3HHx en el copolímero, con un descenso progresivo y continuado de la cristalinidad con el aumento del porcentaje molar de 3HHx presente, como corresponde por la introducción de una cantidad cada vez mayor de defectos en la estructura cristalina del monómero de P3HB.

I-4. BIOCOMPATIBILIDAD

La interacción entre un material y un tejido se describe con el término de biocompatibilidad, definiéndose de modo general como:

“la capacidad de un material para desarrollar una respuesta adecuada como anfitrión (de un tejido, células, etc.) en una determinada aplicación”

Esto implica que cualquier material injertado en el cuerpo no debe ser inerte y tiene que interaccionar con el tejido. La respuesta biológica de una material depende básicamente de tres factores: las propiedades del material, las características del anfitrión, y las demandas funcionales del material. Por tanto, es importante tener en cuenta que la biocompatibilidad de un material sólo puede ser evaluada en base al tejido o célula para la que se usará como soporte y debe ser definida de modo inequívoco para cada aplicación.

La biocompatibilidad de los P3HAs viene determinada por la presencia del P3HB como componente de la membrana celular de los animales, incluido el ser humano. También se ha detectado presencia de cantidades relativamente grandes de P3HB de bajo peso molecular y su producto de degradación, el ácido 3-hidroxibutírico, en la sangre humana. Todos estos factores, junto con el conocimiento de que el ácido 3-hidroxibutírico es un metabolito en el organismo de todos los seres vivos superiores,

ha permitido que desde hace tiempo el P3HB y sus copolímeros (cuyos productos de degradación son los mismos) sean considerados como un compuesto no tóxico.^{53,54} Además estos polímeros muestran en muchos casos mejor biocompatibilidad que otros biopolímeros como PLLA o PLA.³⁵

I-5. BIODEGRADACIÓN

Además de la necesidad de un material de presentar propiedades mecánicas y de biocompatibilidad adecuadas, también es necesario que un implante temporal en el organismo se degrade dentro de periodos clínicos adecuados, esto es, es necesario que se degrade transcurrido el tiempo necesario para el desarrollo de la función para la que fue diseñado.

Cuando la degradación es ocasionada por la acción de microorganismos tales como bacterias hongos o algas, se puede denominar biodegradación. El grado de biodegradación de los materiales a emplear en regeneración tisular marcará su elección en función de los requerimientos deseados.

En el cuerpo humano el proceso de biodegradación que se produce es principalmente enzimático (pudiéndose ser también hidrolítico, oxidativo...). Dado que el P3HB y sus copolímeros con alto peso molecular no pueden atravesar la pared celular, varios microorganismos excretan PHB depolimerasas que actúan hidrolizando el polímero sólido en monómeros y oligómeros de (R)-3HB solubles en agua. Estos productos son excretados por el organismo a través de las vías normales, pues son parte constituyente de su medio fisiológico (apartado I-4).

El efecto de la estructura química que la segunda unidad monomérica y la composición copolimérica puede tener en la actividad catalítica ha sido ampliamente estudiado,⁵⁵⁻⁵⁸ concluyendo que el proceso degradativo es el mismo en los copolímeros que contienen 3HB que en el homopolímero P3HB.

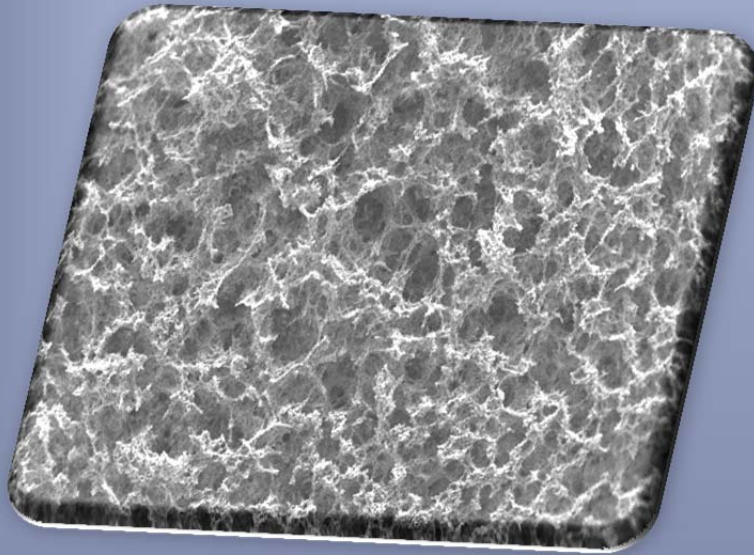
Además de la composición copolimérica, numerosos son los factores que afectan a la degradación de los P3HAs en el medio biológico: hidrofiliidad, forma, peso molecular y grado de cristalinidad. Pero el resultado final del proceso biodegradativo son oligómeros o monómeros que son excretados por el organismo, haciendo de los

P3HAs materiales ideales para su uso en la reparación, regeneración y sustitución de tejidos.

I-6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Langer, R.; Vacanti, J. P. *Science* **1993**, 260, 920.
- (2) Nerem, R. M. *Annals of Biomedical Engineering* **1991**, 19, 529.
- (3) Holzwarth, J. M.; Ma, P. X. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, 21, 10243.
- (4) Vert, M. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2007**, 32, 755.
- (5) Rahaman, M. N.; Day, D. E.; Sonny Bal, B.; Fu, Q.; Jung, S. B.; Bonewald, L. F.; Tomsia, A. P. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, 2355.
- (6) Babensee, J. E.; McIntire, L. V.; Mikos, A. G. *Pharmaceutical Research* **2000**, 17, 497.
- (7) Shea, L. D.; Smiley, E.; Bonadio, J.; Mooney, D. J. *Nature Biotechnology* **1999**, 17, 551.
- (8) Wang, X.; Han, C.; Hu, X.; Sun, H.; You, C.; Gao, C.; Haiyang, Y. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2011**, 4, 922.
- (9) Hutmacher, D. W. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2001**, 12, 107.
- (10) L'Heureux, N.; Dusserre, N.; Marini, A.; Garrido, S.; de la Fuente, L.; McAllister, T. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* **2007**, 4, 389.
- (11) Hollister, S. J. *Nature Materials* **2005**, 4, 518.
- (12) Butler, D. L.; Juncosa-Melvin, N.; Boivin, G. P.; Galloway, M. T.; Shearn, J. T.; Gooch, C.; Awad, H. *Journal of Orthopaedic Research* **2008**, 26, 1.
- (13) Moutos, F. T.; Freed, L. E.; Guilak, F. *Nature Materials* **2007**, 6, 162.
- (14) Cukierman, E.; Pankov, R.; Stevens, D. R.; Yamada, K. M. *Science* **2001**, 294, 1708.
- (15) Curtis, A. S.; Dalby, M.; Gadegaard, N. *Nanomedicine (London, England)* **2006**, 1, 67.
- (16) Stevens, M. M.; George, J. H. *Science* **2005**, 310, 1135.
- (17) Engelmayr Jr, G. C.; Cheng, M.; Bettinger, C. J.; Borenstein, J. T.; Langer, R.; Freed, L. E. *Nature Materials* **2008**, 7, 1003.
- (18) Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. *Cell* **2006**, 126, 677.
- (19) Pelham Jr, R. J.; Wang, Y. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94, 13661.
- (20) Place, E. S.; Evans, N. D.; Stevens, M. M. *Nature Materials* **2009**, 8, 457.
- (21) Schense, J. C.; Bloch, J.; Aebischer, P.; Hubbell, J. A. *Nature Biotechnology* **2000**, 18, 415.
- (22) Silva, G. A.; Czeisler, C.; Niece, K. L.; Beniash, E.; Harrington, D. A.; Kessler, J. A.; Stupp, S. I. *Science* **2004**, 303, 1352.
- (23) Benoit, D. S. W.; Anseth, K. S. *Biomaterials* **2005**, 26, 5209.
- (24) Comisar, W. A.; Kazmers, N. H.; Mooney, D. J.; Linderman, J. J. *Biomaterials* **2007**, 28, 4409.
- (25) Underwood, P. A.; Bennett, F. A.; Kirkpatrick, A.; Bean, P. A.; Moss, B. A. *Biochemical Journal* **1995**, 309, 765.
- (26) Vogler, E. A. *Advances in Colloid and Interface Science* **1998**, 74, 69.
- (27) Keselowsky, B. G.; Collard, D. M.; García, A. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 5953.
- (28) Amass, W.; Amass, A.; Tighe, B. *Polymer International* **1998**, 47, 89.
- (29) Ueda, H.; Tabata, Y. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, 501.
- (30) Chan, B. P.; Leong, K. W. *European Spine Journal* **2008**, 17, S467.
- (31) Asrar, J.; Valentin, H. E.; Berger, P. A.; Tran, M.; Padgett, S. R.; Garbow, J. R. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1006.
- (32) Anderson, A. J.; Dawes, E. A. *Microbiological Reviews* **1990**, 54, 450.
- (33) Steinbuchel, A.; Valentin, H. E. *FEMS Microbiology Letters* **1995**, 128, 219.
- (34) Misra, S. K.; Valappil, S. P.; Roy, I.; Boccaccini, A. R. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2249.
- (35) Chen, G. Q.; Wu, Q. *Biomaterials* **2005**, 26, 6565.
- (36) Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, 5.
- (37) Asrar, J.; Hill, J. C. *Journal of Applied Polymer Science* **2001**, 83, 457.

- (38) Korsatko, W.; Wabnegg, B.; Braunegg, G. *POLY-D(-)-3-HYDROXYBUTTERSAURE (PHB): EIN BIOLOGISCH ABBAUBARER ARZNEISTOFFTRAGER ZUR LIBERATIONSVERZÖGERUNG. I MITT.: ENTWICKLUNG VON PARENTERAL APPLIZIERBAREN MATRIXTABLETTEN ZUR LANGZEITABGABE VON ARZNEISTOFFEN* **1983**, 45, 525.
- (39) Korsatko, W.; Wabnegg, B.; Tillian, H. M. *POLY-D(-)-3-HYDROXYBUTTERSAURE: EIN BIOLOGISCH ABBAUBARER ARZNEISTOFFTRAGER ZUR LIBERATIONSVERZÖGERUNG. II. MITT.: ÜBER DIE BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT IM TIERISCHEN ORGANISMUS UND DIE MATRIX-RETARDTABLETTEN* **1983**, 45, 1004.
- (40) Korsatko, W.; Wabnegg, B.; Tillian, H. M. *POLY-D(-)-3-HYDROXYBUTTERSAURE - EIN BIOLOGISCH ABBAUBARER ARZNEISTOFFTRAGER ZUR LIBERATIONSVERZÖGERUNG. 3. MITT.: GEWEBSVERTRÄGLICHKEITSTUDIEN PARENTERAL APPLIZIERBARER POLY-D(-)-3-HYDROXYBUTTERSAURE-TABLETTEN IN GEWEBEKULTUR UND IN VIVO* **1984**, 46, 952.
- (41) Hazari, A.; Johansson-Rudén, G.; Junemo-Bostrom, K.; Ljungberg, C.; Terenghi, G.; Green, C.; Wiberg, M. *Journal of Hand Surgery: European Volume* **1999**, 24, 291.
- (42) Hazari, A.; Wiberg, M.; Johansson-Rudén, G.; Green, C.; Terenghi, G. *British Journal of Plastic Surgery* **1999**, 52, 653.
- (43) Ljungberg, C.; Johansson-Rudén, G.; Junemo Boström, K.; Novikov, L.; Wiberg, M. *Microsurgery* **1999**, 19, 259.
- (44) Novikov, L. N.; Novikova, L. N.; Mosahebi, A.; Wiberg, M.; Terenghi, G.; Kellerth, J. O. *Biomaterials* **2002**, 23, 3369.
- (45) Freier, T.; Kunze, C.; Nischan, C.; Kramer, S.; Sternberg, K.; Saß, M.; Hopt, U. T.; Schmitz, K. P. *Biomaterials* **2002**, 23, 2649.
- (46) Kunze, C.; Bernd, H. E.; Androsch, R.; Nischan, C.; Freier, T.; Kramer, S.; Kramp, B.; Schmitz, K. P. *Biomaterials* **2006**, 27, 192.
- (47) Janigová, I.; Lacík, I.; Chodák, I. *Polymer Degradation and Stability* **2002**, 77, 35.
- (48) Avella, M.; Martuscelli, E.; Raimo, M. *Journal of Materials Science* **2000**, 35, 523.
- (49) Bluhm, T. L.; Hamer, G. K.; Marchessault, R. H.; Fyfe, C. A.; Veregin, R. P. *Macromolecules* **1986**, 19, 2871.
- (50) Scandola, M.; Ceccorulli, G.; Pizzoli, M.; Gazzano, M. *Macromolecules* **1992**, 25, 1405.
- (51) Shimamura, E.; Kasuya, K. I.; Kobayashi, G.; Shiotani, T.; Shima, Y.; Doi, Y. *Macromolecules* **1994**, 27, 878.
- (52) Alata, H.; Aoyama, T.; Inoue, Y. *Macromolecules* **2007**, 40, 4546.
- (53) Lee, S. Y. *Biotechnology and Bioengineering* **1996**, 49, 1.
- (54) Reusch, R. N.; Sparrow, A. W.; Gardiner, J. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* **1992**, 1123, 33.
- (55) Faezah, A. N.; Rahayu, A.; Vigneswari, S.; Majid, M. I. A.; Amirul, A. A. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2011**, 27, 2455.
- (56) Papaneophytou, C. P.; Velali, E. E.; Pantazaki, A. A. *Polymer Degradation and Stability* **2011**, 96, 670.
- (57) Doi, Y.; Kitamura, S.; Abe, H. *Macromolecules* **1995**, 28, 4822.
- (58) Shimamura, E.; Scandola, M.; Doi, Y. *Macromolecules* **1994**, 27, 4429.



II-EMPLEO DE COPOLÍMEROS DE P3HB3HV PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO UROTELIAL

La alta hidrofobicidad de los sustratos de P3HB3HV hace necesaria su modificación superficial con el fin de mejorar su interacción con la matriz extracelular y las células. Mediante tratamientos químicos superficiales y el injerto de moléculas bioactivas se consigue aumentar la humectabilidad del sustrato y facilitar su interacción con el entorno celular.

II-1. INTRODUCCIÓN

II-1.1. RECONSTRUCCIÓN DEL APARATO URINARIO

El aparato urinario está expuesto a una gran cantidad de lesiones desde el inicio de su desarrollo embrionario. Junto con estos defectos congénitos (reflujo vesicouretral, espisadías, etc), trastornos adquiridos, tales como traumas, infecciones, cáncer, inflamaciones y lesiones iatrogénicas, requieren normalmente la sustitución parcial o total del tejido enfermo o perdido. Desde el inicio de las terapias reconstructivas del aparato urinario se ha producido una falta acuciante de tejido urológico autólogo, lo que ha obligado al uso de tejidos heterólogos, como piel, tracto gastro-intestinal, mucosa bucal, etc.

La solución quirúrgica más extendida es la de utilizar un segmento autólogo de intestino como sustituto del tejido urotelial no funcional. Sin embargo, existe un alto grado de morbilidad asociado con este procedimiento y de modo muy raro se regeneran por completo las funciones del órgano original. Además, los tejidos empleados en la reconstrucción pueden producir complicaciones debidas a su diferente funcionalidad inherente. El epitelio intestinal es incompatible con la exposición prolongada a la orina.¹ La formación de piedras y la posibilidad de desarrollar un cáncer, representan los principales inconvenientes de esta aproximación.²

Estos graves inconvenientes han motivado a numerosos investigadores en la búsqueda de materiales y métodos alternativos para sustituir o regenerar el tejido urotelial. Entre estos métodos, el uso de polímeros biodegradables como soportes para el crecimiento *in vitro* de tejido urotelial con células o tejido procedente del propio paciente, parece representar una de las aproximaciones más prometedoras.³ En una situación ideal, una vez que el soporte de polímero con células es implantado, el polímero debería reabsorberse a una velocidad comparable con la requerida por el tejido para recuperar su funcionalidad. Actualmente no existen muchos estudios en los que se haya investigado las interacciones de las células humanas derivadas del tracto urinario con poliésteres biodegradables.³⁻⁷

II-1.2. USO DE POLIÉSTERES BIODEGRADABLES PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDO UROTELIAL

Los componentes básicos del tejido urológico nativo son el urotelio, la matriz extracelular y el músculo liso. El urotelio actúa principalmente como una barrera impermeable. Así, este epitelio estratificado previene la permeación y absorción de componentes tóxicos desde la orina, así como las fugas de orina.⁸ El músculo liso ofrece un soporte mecánico al del tracto urinario. En la vejiga, las células del músculo liso ayudan en la contención urinaria. La matriz extracelular, además de servir como soporte mecánico y base para la adhesión celular, también regula las interacciones entre las células uroteliales y del músculo liso y su comportamiento proliferativo y funcional.

El empleo de un material artificial para la reconstrucción o sustitución del tejido urotelial, lleva asociados una serie de requerimientos inherentes al tejido que se desea reemplazar. Así, el material a utilizar en la reconstrucción del tracto urinario y la vejiga, debe ser impermeable y poseer las propiedades mecánicas adecuadas para realizar su función fisiológica. Además, debe presentar unas características superficiales idóneas para promover y potenciar la adhesión y proliferación celular.

En base a estos requisitos, el empleo de copolímeros de poli(3-hidroxibutirato), representa una alternativa plausible al uso de tejido nativo en la reconstrucción de tejido urotelial. El copolímero de poli(3-hidroxibutirato), P3HB3HV, mejora las propiedades del P3HB, y potencialmente sus propiedades mecánicas y de impermeabilidad que pueden ser explotadas en la ingeniería tisular de vejiga y urotelial. Además, tiene la ventaja de que puede ser obtenido con una composición definida y de un modo reproducible.

II-1.3. MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE SUSTRATOS POLIMÉRICOS PARA SU APLICACIÓN EN TERAPIAS REGENERATIVAS

Las propiedades superficiales de cualquier material con aplicaciones biomédicas son de vital importancia, ya que la superficie es el medio a través del cual se produce la interacción entre el material y las células y los diferentes tejidos. Mediante la modificación de la topografía superficial, de su humectabilidad y/o de los grupos funcionales situados en la superficie, es posible diseñar materiales para usos biomédicos específicos. Entre las técnicas de modificación superficial más usuales se incluyen

tratamientos con plasma de gases, irradiación ultravioleta (UV), irradiación γ , irradiación con rayos de electrones y tratamiento químico (injerto, hidrólisis alcalina, etc.).⁹

En el caso de los copolímeros de P3HB3HV, a pesar de sus buenas propiedades de biocompatibilidad, sus superficies hidrofóbicas los hacen muy poco viables para la adhesión y proliferación celular. Para superar estas limitaciones, el recubrimiento de los polímeros con proteínas presentes en la matriz extracelular es una estrategia muy empleada. La hipótesis de trabajo es que la inmovilización de estas moléculas sobre la superficie de los materiales empleados en ingeniería tisular imita el entorno *in vivo*. Así, en trabajos recientes se ha investigado el efecto del recubrimiento con proteínas en el desarrollo de tejido urotelial.¹⁰⁻¹² Hudson y colaboradores¹² han investigado el efecto de cuatro recubrimientos con proteínas adsorbidas: colágeno tipos I y IV, fibronectina y laminina. Específicamente, estudiaron el efecto de la adhesión inicial, la proliferación y la actividad metabólica de los cultivos de células uroteliales. Estos autores encontraron una correlación entre el recubrimiento con proteínas y la respuesta celular. Sin embargo, el uso de proteínas tiene algunas desventajas con respecto a su uso en aplicaciones médicas. En primer lugar, las proteínas tienen que ser aisladas de otros organismos y purificadas. Esto puede dar lugar a respuestas inmunes indeseadas e incrementar el riesgo de infección.¹³ Junto a estos riesgos, la presencia de proteínas séricas, como la albúmina, podrían desplazar las proteínas del recubrimiento proteico inicial, haciendo este procedimiento ineficiente.

Para superar estos problemas, los polímeros sintéticos podrían ser modificados mediante la unión covalente de fragmentos peptídicos con actividad biológica. Este procedimiento ha sido empleado para incrementar la adhesión y proliferación celular de varias líneas celulares.¹⁴⁻¹⁹ Se ha sugerido que tener un enlace estable entre la proteína o fragmento peptídico y la superficie es esencial para favorecer una adhesión celular fuerte, porque la formación de adhesiones localizadas sólo ocurren si el ligando resta las fuerzas de contracción celulares.^{11,13-19}

De igual modo a otros poliésteres biodegradables, el P3HB3HV carece de funcionalidades para anclar estas moléculas. Sin embargo, es posible producir grupos funcionales en la superficie de los sustratos mediante tratamiento químico, como por ejemplo hidrólisis alcalina o aminólisis.^{9,14,16-18} Además de un aumento en la

hidrofilicidad de la superficie, estos grupos funcionales pueden ser usados para anclar moléculas bioactivas. Teniendo en cuenta esto, la principal propuesta de este capítulo es el estudio de la aplicabilidad de sustratos de P3HB3HV para sustitución de vejiga en forma de películas.

Por ello, en este apartado se describe la modificación superficial de los sustratos de P3HB3HV con hidróxido sódico (NaOH) y etilendiamina (ED) y la evaluación de sus propiedades tras el proceso de modificación química llevado a cabo. Los nuevos grupos funcionales introducidos en la superficie se emplearon para unir covalentemente el fragmento de laminina YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), y se estudió la influencia de esta funcionalización en las propiedades de las películas. Esta secuencia peptídica es funcionalmente activa para promover la adhesión y crecimiento celulares, en soportes extracelulares de modo general y en la membrana basal urotelial de modo más concreto.²⁰ Para evaluar este efecto, después de la modificación superficial y el injerto de los diferentes fragmentos peptídicos, se realizaron ensayos biológicos con células uroteliales porcinas en los sustratos.

II-2. MATERIALES Y MÉTODOS

II-2.1. MATERIALES

Poly(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P3HB3HV)

El copolímero P3HB3HV con el 12 % molar de 3-hidroxivalerato ($\bar{M}_w = 230000 \text{ g mol}^{-1}$) fue suministrado por Aldrich (Steinheim, Alemania) y se empleó sin purificación previa.

Reactivos

La etilendiamina fue suministrada por Fluka (Steinheim, Alemania) y el hidróxido sódico se adquirió a Panreac (Barcelona, España). Ambos reactivos se emplearon sin purificación previa.

La ninhidrina para evaluar los grupos amino, el clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y la sal sódica de *N*-hidroxisulfosuccinimida (NHS o sulfo-NHS) utilizados para la unión covalente de la laminina, y el fragmento

peptídico de lamina YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Las propiedades mecánicas se determinaron en muestras cosidas con sutura comercial de “vicryl” (poliglactina 910 cubierta con vicryl) (Industrias Ethicon).

La dispa y los reactivos para la obtención del medio de cultivo y crecimiento celular fueron suministrados por Gibco.

Disolventes

El cloroformo (CHCl_3) empleado en la disolución del polímero para obtención de las películas fue suministrado por Carlo Erba Réactifs-SdS (Val de Reuil, Francia).

El agua desionizada empleada en todas las reacciones y disoluciones fue Milli.Q obtenida de un equipo de purificación millipore Milli-U 10.

La disolución tampón de MES se realizó con el ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico suministrado por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).

La disolución tampón de fosfato (PBS) se preparó con fosfato sódico dihidrogenado anhidro (Fluka $\geq 99\%$), hidrogeno fosfato disódico (Panreac, Barcelona, España, $\geq 98\%$) y cloruro sódico (Panreac $\geq 99\%$) para mantener la fuerza iónica (μ) de la disolución constante y controlada.

El isopropanol utilizado en los ensayos de cuantificación con ninhidrina fue suministrado por Panreac (Barcelona, España) y el etanol para la disolución de la ninhidrina y la esterilización de los sustratos poliméricos antes de los ensayos celulares, por VWR ProLAB (Fountain-Sous-Bois, Francia).

II-2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Obtención de Películas de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)

Las películas de P3HB3HV se prepararon por el método de colada. En un procedimiento estándar, se disolvió el polímero en cloroformo (50 mg mL^{-1}) a 50°C durante 3 horas y se vertió la disolución en un molde de vidrio, manteniéndola a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del disolvente. Transcurrido este

tiempo de evaporación, el peso de las muestras se mantuvo constante obteniéndose películas de $\sim 70 \pm 1 \mu\text{m}$ (Figura II-1.). Las películas se almacenaron a -18°C hasta su uso para minimizar su envejecimiento.

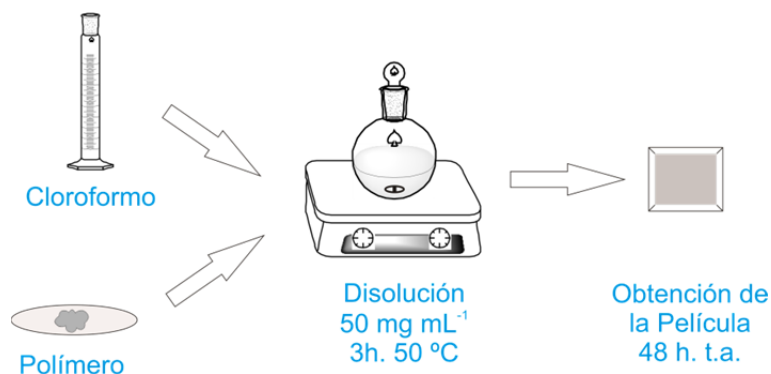


Figura II-1: Esquema general del proceso de obtención de las películas de PHAs mediante el método de colada.

Modificación Superficial con Hidróxido Sódico

Se ha demostrado que los tratamientos de sustratos poliméricos con disoluciones alcalinas introducen grupos funcionales hidroxilo y carboxilo en las superficies poliméricas. Estas nuevas funcionalidades contribuirán a la disminución del ángulo de contacto, lo que debería facilitar la interacción de los sustratos poliméricos con la matriz extracelular y las células.

Para el tratamiento de las películas de P3HB3HV, sustratos de $4 \times 2 \text{ cm}^2$ se trataron a 30°C con una disolución acuosa de NaOH 1M. Se escogieron distintos tiempos de tratamiento en un intervalo de tiempo comprendido entre 30 y 200 min.

El procedimiento seguido se esquematiza en la Figura II-3. Para ello, los sustratos se introdujeron en un matraz de reacción con la disolución previamente atemperada y se agitaron durante el tiempo deseado. Transcurrido el tiempo de reacción, se extrajeron los sustratos rápidamente de la disolución y se lavaron con abundante agua desionizada. Para evitar la retención de NaOH en la superficie del sustrato, las muestras se lavaron con 800 mL de agua desionizada durante 24 horas a temperatura ambiente, bajo agitación, renovando el agua de lavado 3 veces durante este tiempo. Con posterioridad las muestras se secaron a vacío durante 3 h y se almacenaron a -18°C en condiciones hidrofílicas.

La reactividad química producida con el tratamiento químico y los nuevos grupos formados se esquematiza en la Figura II-2.

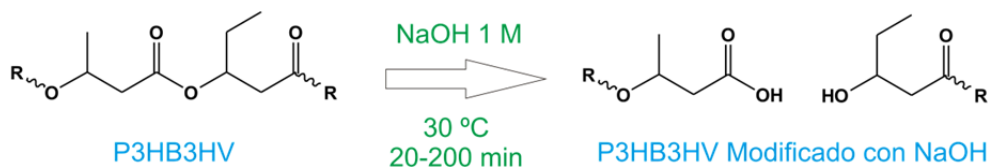


Figura II-2: Esquema general de la reacción química con NaOH de las cadenas poliméricas de P3HB3HV.

Modificación Superficial con Etilendiamina

La alta hidrofobicidad de los sustratos de P3HB3HV dificulta la interacción de los sustratos con la matriz extracelular y las células. Para mejorar estas interacciones, los sustratos fueron modificados con etilendiamina en fase heterogénea, lo que además permite introducir las funcionalidades necesarias para el posterior anclaje del fragmento peptídico.

Para el copolímero P3HB3HV se trataron películas de $4 \times 2 \text{ cm}^2$. En este caso se emplearon disoluciones acuosas con el 20 % o 40 % en volumen de etilendiamina, tratándose los sustratos a 50°C durante distintos tiempos comprendidos en el intervalo de 20-360 min. El procedimiento de modificación es similar al descrito en el apartado anterior “Modificación Superficial con Hidróxido Sódico” y cuyo esquema general se presenta en la Figura II-3.

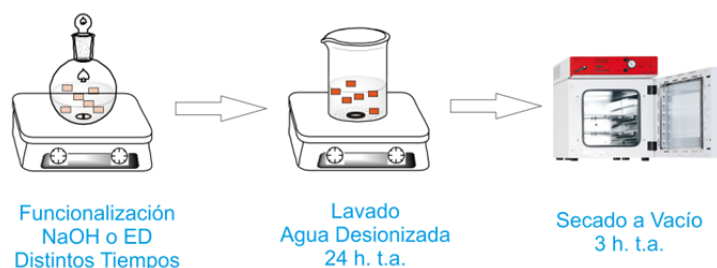


Figura II-3: Esquema general del procedimiento de modificación de los sustratos poliméricos mediante tratamiento químico en fase heterogénea con NaOH o ED.

La reacción química con ED introduce grupos amina y amida en la superficie de los sustratos, tal y como se muestra en la Figura II-4:

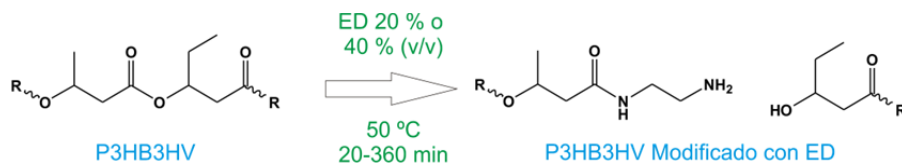


Figura II-4: Esquema general de la reacción química con ED de las cadenas poliméricas de P3HB3HV.

Unión Covalente de Fragmentos Peptídicos de Laminina

Los poliésteres alifáticos de la familia de los PHAs carecen de grupos funcionales reactivos en su superficie. Mediante los tratamientos químicos con NaOH y ED, además de aumentar la hidrofiliidad del sustrato, se consigue introducir grupos funcionales ácido y amino a lo largo de la estructura polimérica. Estos grupos pueden servir como puntos de reacción para la unión covalente de moléculas, y en nuestro caso, se emplearon para la unión covalente del fragmento pentapeptídico de laminina YIGSR. Para ello, se siguieron dos procedimientos diferentes dependiendo de la funcionalización previa obtenida, cuya química se detalla en la Figura II-5.

Cuando los grupos funcionales introducidos son grupos amino, el procedimiento de unión es el descrito a continuación. El fragmento peptídico, la EDC y el NHS se disolvieron en una disolución 0.1 M de tampón MES (pH 6.0) en relación molar péptido:EDC:NHS igual a 1000:1:0.1. A continuación, las películas (superficie total 32 cm²) se introdujeron en la disolución con el fragmento peptídico (8.4 μM) activado, haciéndose reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente con agitación (120 rpm). Finalizada la reacción, los sustratos fueron lavados con disolución tampón de PBS (pH 7.4) durante 1 h y aclarados varias veces con abundante agua desionizada. Después del lavado las muestras se secaron durante 3 h a vacío y se almacenaron a -18 °C hasta su utilización. Una representación esquemática de la reacción química que se produce se ilustra en la Figura II-5 A).

Para el caso de las películas de P3HB3HV tratadas con disolución acuosa de NaOH, los grupos funcionales introducidos son hidroxilo y ácido, y el proceso de unión covalente del fragmento YIGSR es distinto al anterior. Las películas se introdujeron en

una disolución 0.1 M de tampón MES (pH 6.0) conteniendo 10 mM de EDC y 10 mM de NHS para activar los grupos funcionales carboxilo de la superficie de las películas. El tiempo de reacción fue de 6 horas con agitación a 120 rpm. Las películas activadas se lavaron 6 veces con agua desionizada para eliminar el exceso de EDC y NHS y a continuación se introdujeron en una disolución tampón de PBS (pH 7.4) con 8.4 μ M de YIGSR. Se mantuvieron con agitación a 120 rpm durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción determinado, las películas se lavaron con agua desionizada varias veces y se secaron a vacío durante 3 h. Las muestras se almacenaron a -18 °C hasta su utilización posterior. En la Figura II-5 B) se muestra un esquema general del procedimiento empleado para las superficies tratadas con NaOH.

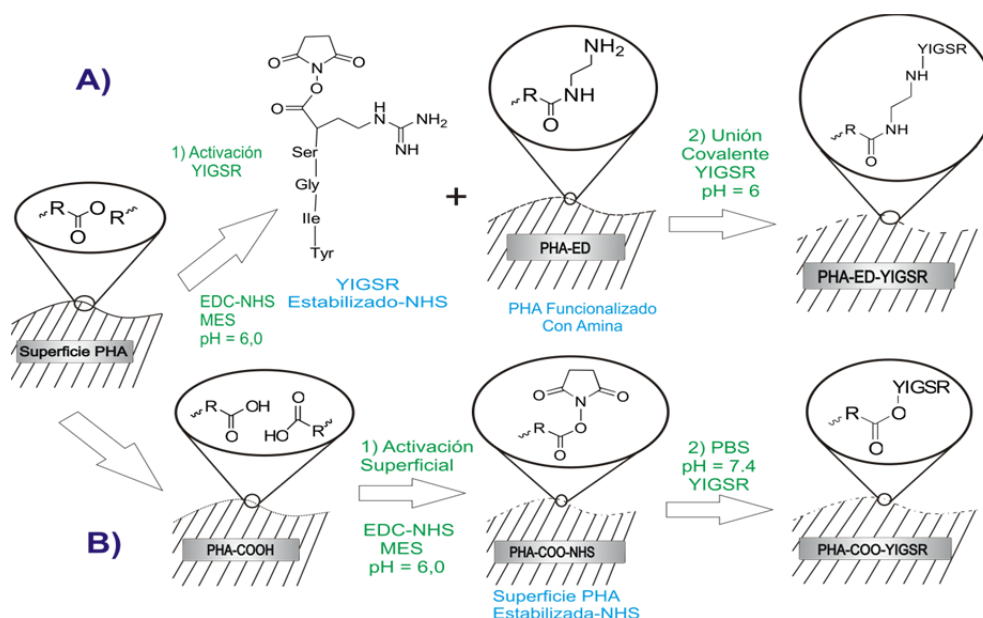


Figura II-5: Representación esquemática del proceso de unión covalente de los fragmentos peptídicos a los sustratos previamente funcionalizados con A) ED y B) NaOH.

Medidas de Ángulo de Contacto (CA, del inglés Contact Angle)

La superficie del polímero, así como sus propiedades interfaciales son de gran importancia en la biocompatibilidad del mismo. Uno de los parámetros que controla la interacción con el medio es la humectabilidad del polímero, que indica la respuesta del material en medio acuoso. La humectabilidad representa una medida de la interacción de un líquido con un sólido. Un método para estimar la magnitud de esta interacción consiste en medir el ángulo de contacto que forma una gota de líquido sobre la superficie sólida. Dependiendo del grado de interacción entre el líquido y el sólido, se

puede hablar de humectación total, cuando el ángulo de contacto entre líquido y sólido es cero, o de condición no humectante, si el ángulo es superior a 90° . Las condiciones intermedias, $0^\circ < \text{ángulo} < 90^\circ$, son consideradas como condiciones de humectabilidad parcial. El esquema de la Figura II-6 representa la variación del ángulo de contacto en función de las condiciones de humectabilidad.



Figura II-6: Diferentes condiciones de humectabilidad de una gota en contacto con una superficie sólida. A) condiciones de pobre humectabilidad o no humectabilidad y B) condiciones de buena humectabilidad o humectabilidad parcial.

Es posible utilizar diferentes métodos para la medida del ángulo de contacto, y la elección de uno u otro depende de las características del material (superficie, forma de la muestra...). En nuestro caso, con muestras en forma de película, se ha empleado el método de la gota estática, siendo este método el más ampliamente utilizado para el estudio de superficies poliméricas.

Para la medida se depositó una gota ($5\ \mu\text{L}$) de agua desionizada sobre la superficie del material y se midió el ángulo de contacto mediante el uso de un goniómetro, en nuestro caso un goniómetro KSV theta. La estimación de los ángulos de contacto se realizó mediante un programa que permite la determinación de la línea base y tangente a partir de fotografías de las gotas. Se analizaron al menos 5 gotas para cada película, dándose los resultados como la media de las cinco medidas \pm la desviación estándar.

Ensayo de Ninhidrina

La cuantificación de los grupos amino en las muestras tratadas con ED se llevó a cabo mediante ensayo de ninhidrina. La ninhidrina se une a los grupos amino presentes en la superficie del sustrato formando un pigmento púrpura,²¹ con un máximo de absorción en torno a 560 nm en una mezcla isopropanol/cloroformo (1:1) Figura II-7.

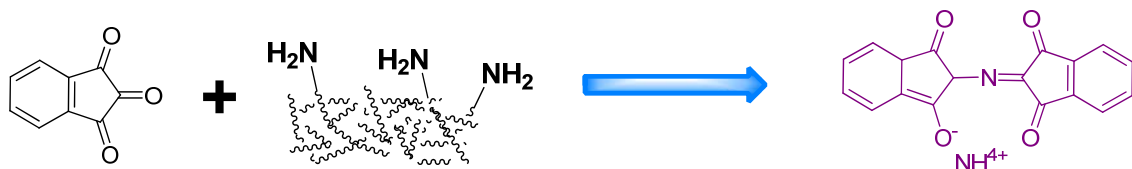


Figura II-7: Esquema de la reacción de la ninhidrina con los grupos amino de la superficie de los sustratos poliméricos tratados con ED o de los fragmentos peptídicos.

Así, 6 discos de 4 mm de diámetro se hicieron reaccionar con la ninhidrina durante 1 min, mediante inmersión en una disolución 1 M de ninhidrina en etanol. A continuación, las muestras se introdujeron en un vial de vidrio y se calentaron a 70 °C durante 15 min en un baño de agua, para activar la reacción con la ninhidrina.²² Transcurrido el tiempo de reacción necesario para la formación del pigmento púrpura, las muestras se disolvieron en una mezcla 1:1 isopropanol/cloroformo. Después de disolver las muestras completamente a temperatura ambiente, se registró el espectro ultravioleta-visible (UV-Vis) (800-400 nm) y se determinó la absorbancia máxima a 560 nm. Mediante el empleo de una recta de calibrado previa, obtenida a partir de los valores medidos de absorbancia a 560 nm de disoluciones de ED en isopropanol/cloroformo (1:1) de concentración conocida (coeficiente de extinción molar $\epsilon_{560 \text{ nm}} = 701.2 \pm 58.5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), se calculó la cantidad de grupos amino en la superficie de los distintos sustratos. Los resultados se presentaron por unidad de superficie como $\mu\text{molNH}_2 \text{ cm}^{-2}$. Considerando que el fragmento peptídico tiene grupos amino en su estructura, el método de cuantificación mediante ensayo de ninhidrina también fue empleado para la cuantificación de unión covalente del fragmento peptídico.

Microscopía Infrarroja por Transformada de Fourier Mediante Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR, del inglés Fourier Transform Infrared Spectroscopy-Attenuated Total Reflectance)

La presencia de grupos amino en la superficie de los sustratos tratados con ED se determinó mediante microscopía ATR-FTIR. Los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro Spectrum 2000 FTIR (Perkin-Elmer, Beaconsfield, UK), empleando un cristal de germanio de 25 mm de diámetro de reflexión simple (índice de reflexión $n = 4.0$). Los espectros se registraron con un ángulo de incidencia de 45°, a 4 cm^{-1} de resolución espectral, entre 4000 y 600 cm^{-1} y acumulando 30 barridos. Todos los

espectros se corrigieron a espectros de absorbancia usando una ley simple de dependencia de la longitud de onda asumiendo un contacto óptimo entre la superficie y el cristal. Para asegurar la homogeneidad del tratamiento en toda la superficie, se registraron espectros en diferentes regiones de las películas.

Análisis Elemental

La cantidad relativa de elementos carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N) se determinó mediante análisis elemental, empleando un equipo Leco CHNS-932 (Leco Co., St. Joseph, Estados Unidos). Para ello, 1 mg de muestra se introdujo en la cámara de descomposición en atmósfera de He. Las muestras se descompusieron a 1000 °C y se oxidaron mediante reacción oxígeno, obteniéndose CO₂, H₂O y NO_x.

Para la cuantificación de C e H se empleó detección mediante IR y para el N se usó un detector térmico. La cantidad de O se determinó a partir de la diferencia hasta el 100 % de composición de la muestra, ya que C, H, N y O son los cuatro elementos constituyentes de las muestras analizadas.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, del inglés Scanning Electron Microscopy)

El tratamiento químico va dirigido a la modificación superficial, pudiendo afectar a la morfología superficial de las películas de P3HB3HV. Dado que la morfología superficial juega un papel importante en la interacción sustrato-célula, las superficies de las películas de P3HB3HV químicamente tratadas fueron analizadas con microscopía electrónica de barrido. Las muestras se recubrieron con una capa Au-Pd (80/20) de 10 nm de espesor y se observaron en un microscopio electrónico de barrido ambiental de alta resolución PHILIPS XL 30 trabajando a 25 kV.

Medida de las Propiedades Mecánicas

La aproximación propuesta para la regeneración y reparación de tejido vesical con los sustratos modificados de PHBHV requiere su sutura al resto de tejido no sustituido, y resistencia al desgarro cuando la vejiga se expande. Por ello, se realizaron experimentos mecánicos encaminados a reproducir, en la manera de lo posible, las condiciones *in vivo*, y determinar en que medida las películas modificadas de P3HB3HV son adecuadas para esta aplicación.

Para realizar estos ensayos, películas de P3HB3HV sin tratar y tratadas con ED al 40 % en volumen durante 40, 80 y 120 minutos, de 70 ± 1 micra de espesor, se cortaron en muestras rectangulares de 2.5×0.6 cm. Cada muestra se fijó longitudinalmente a lo largo de la línea central a 1 cm de su borde transversal, a 1 cm del borde transversal de una muestra de caucho comercial de dimensiones similares ($2.5 \times 0.6 \times 0.1$ cm), mediante sutura comercial de “vicryl”. Así, las dos películas permanecen cercanas entre sí.

Las muestras así dispuestas se colocaron entre las mordazas de un equipo Instron, modelo 4301, fijando la película de P3HB3HV con la mordaza inferior y la película de caucho con la mordaza superior. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente, a una velocidad de 5 mm min^{-1} .

Viscosimetría Capilar

Las medidas de viscosimetría se realizaron para evaluar el proceso de degradación producido en los sustratos de P3HB3HV después del tratamiento químico. Se determinaron los valores de viscosidad intrínseca $[\eta]$ para una película sin tratar y las películas tratadas con ED y NaOH, utilizando un viscosímetro capilar AVS 350 (Schott-Geräte, Hofheim, Germany). Mediante este equipo se realizaron medidas automáticas del flujo en función del tiempo a través de un viscosímetro Ubbelohde para diluciones secuenciadas.

El viscosímetro se introdujo en un baño de precisión de agua (termostato transparente CT 1650, Schott-Geräte, Hofheim, Germany) para mantener la temperatura a 30°C . Se varió la concentración de la disolución de 0.2 a 1 g dL^{-1} para todos los polímeros. Las constantes estimadas por Akita y colaboradores²³ para el P3HB se emplearon en la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada ($[\eta] = 1.18 \bar{M}_w^{0.78}$) para estimar los pesos moleculares medios de las muestras analizadas.

Ensayos Celulares con Células Uroteliales Porcinas

Células uroteliales de origen porcino se emplearon para determinar la biocompatibilidad de las películas modificadas de P3HB3HV con este tipo de células, realizándose los ensayos pertinentes en el Hospital Universitario Fundación de Alcorcón.

Procedimientos de obtención y sembrado de las células uroteliales porcinas

Los procedimientos animales se realizaron de acuerdo con la Directiva 86/609/ECC del Consejo de la Comisión Europea y aprobados por los comités éticos y de investigación animal de la institución. Las biopsias de vejiga de cerdo fueron suministradas por el Departamento de Laparoscopia de “Jesús Usón” del Centro de Cirugía de Mínima Invasión (Cáceres, España). El aislamiento de las células del tejido y su cultivo se realizó tal y como se indica a continuación. Las muestras celulares se obtuvieron a partir de biopsias y fueron procesadas en condiciones asépticas. Mediante disección mecánica se separó el urotelio del músculo subyacente y se realizó la digestión enzimática en las muestras de urotelio con 3 mg mL⁻¹ de Dispasa (Gibco) a 4 °C O/N bajo agitación constante. Las células obtenidas se sembraron directamente en placas de cultivo de 6 cm de diámetro y se expandieron hasta obtener las cantidades adecuadas para los experimentos con los sustratos poliméricos. Para la expansión celular se usó un medio de crecimiento completo de queratinocitos con composición de 3DMEM:1F12 suplementado con factores de crecimiento y hormonas: adenina (0.18 mM), toxina de cólera (0.1 mM), hormona tiroidea (2 nM), insulina bovina (5 µg mL⁻¹), cortisona-OH (0.4 µg mL⁻¹), factor de crecimiento de la epidermis (10 ng mL⁻¹) y tampón Hepes (20 mM).

Estudios in vitro de la interacción películas de PHAs-células uroteliales porcinas

Las células uroteliales porcinas se sembraron en discos (Ø = 14 mm) de las películas modificadas y se incubaron *in vitro*. Las películas se esterilizaron con una disolución de etanol en agua al 70 % en volumen, se secaron, y colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos. Para los experimentos se sembraron 2.0×10^5 células uroteliales por pocillo en placas de cultivo estándar y en las películas, añadiendo de modo suave medio de crecimiento completo de queratinocitos para evitar la flotación de los discos de polímero. Transcurrido el tiempo de estudio deseado, las muestras se retiraron del medio, se lavaron cuidadosamente con PBS para eliminar las células no adheridas. La interacción células-biomaterial se evaluó mediante microscopía de luz invertida (NIKON eclipse T5100). Se determinó el número de células a 40 X en cuatro campos diferentes de 0.2 mm², considerando medidas a 4 y 8 h después del sembrado celular. Se evaluaron películas con diferentes modificaciones para determinar el tratamiento óptimo

mediante ensayos *in vitro* con células uroteliales. Se ensayaron cuatro muestras para cada tipo de tratamiento: P3HB3HV sin modificar, P3HB3HV tratado con disolución acuosa de NaOH 1 M durante 30, 60 y 120 min, P3HB3HV tratado con disolución acuosa de ED al 20 % en volumen durante 40, 80 y 120 min, P3HB3HV tratado con ED al 20 % durante 40 min y el fragmento peptídico YIGSR y P3HB3HV tratado con NaOH 1M durante 30 min y fragmento peptídico YIGSR.

Estudio de la interacción PHAs-células uroteliales porcinas y observación morfológica de las células mediante microscopía electrónica de barrido

La morfología celular es un indicativo de la bondad de la interacción entre las células y el sustrato polimérico. Morfologías esféricas sugieren una pobre interacción célula-sustrato, mientras que morfologías aplanadas con extensiones filopodiales celulares son indicativo de una mejor interacción celular con el sustrato que las soporta. La morfología celular sobre las películas de P3HB3HV se analizó mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello, los cultivos de células uroteliales porcinas sobre los sustratos de P3HB3HV se fijaron con glutaraldehído en disolución tampón (pH 7.4) (1:100), seguido de pasos sucesivos de deshidratación con mezclas etanol/agua, progresivamente más ricas en alcohol. Las muestras se recubrieron con una capa de Au/Pd y se observaron en un microscopio electrónico Philips XL30 (Philips, Eindhoven, Holanda) a temperatura ambiente. Se analizaron los cambios en la morfología celular para distintas muestras sembradas con células uroteliales porcinas: P3HB3HV sin tratamiento, P3HB3HV tratado con disolución acuosa de NaOH 1 M durante 150 min, P3HB3HV tratado con disolución acuosa de ED al 20 % en volumen durante 120 min y P3HB3HV tratado con disolución acuosa de ED al 20 % en volumen durante 120 min con el fragmento YIGSR unido covalentemente.

Estadística

Los resultados se presentan como la media \pm su desviación estándar. Para comparaciones estadísticas, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un estudio de la diferencia significativa de Tukey's (HDS). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

II-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II-3.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

En la Tabla II-1 se presenta la nomenclatura empleada en este capítulo, con la identificación de los tratamientos químicos realizados en cada caso.

Tabla II-1: Tratamiento realizados a las muestras de P3HB3HV estudiadas y la nomenclatura empleada en el capítulo II.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (min)
PHV-ref	NO	0
PHVE-220	ED 20 % (v/v)	20
PHVE-240		40
PHVE-260		60
PHVE-2120		120
PHVE-2180		180
PHVE-2200		200
PHVE-2280		280
PHVE-2360		360
PHVE-240-YIGSR		40
PHVE-420	ED 40 % (v/v)	20
PHVE-440		40
PHVE-460		60
PHVE-4120		120
PHVE-4180		180
PHVE-4200		200
PHVE-4280		280
PHVE-4360		360
PHVN-130	NaOH 1 M	30
PHVN-140		40
PHVN-160		60
PHVN-195		95
PHVN-1150		150
PHVN-1200		200
PHVN-130-YIGSR		30

El sufijo YIGSR en la identificación de las muestras indica se ha anclado a las muestras el fragmento peptídico de laminina YIGSR.

II-3.2. EVALUACIÓN DE LA MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE LOS SUSTRATOS

El procedimiento de funcionalización seleccionado, mediante tratamiento químico en fase heterogénea, debe conducir a la obtención de una modificación

superficial homogénea. El grado de modificación, mediante los tratamientos con NaOH y etilendiamina, se evaluó mediante el empleo de las técnicas descritas, encaminadas al conocimiento del proceso de modificación.

II-3.2.1. MEDIDA DEL ÁNGULO DE CONTACTO

El primer objetivo de los procesos de funcionalización es la disminución del ángulo de contacto de las superficies altamente hidrofóbicas de P3HB3HV. Un método rápido para la determinación de la variación en la hidrofiliidad de la superficie tras los tratamientos químicos es la medida del ángulo de contacto.²⁴

La Figura II-8 muestra el efecto de los tratamientos con ED en la humectabilidad de las superficies de P3HB3HV.

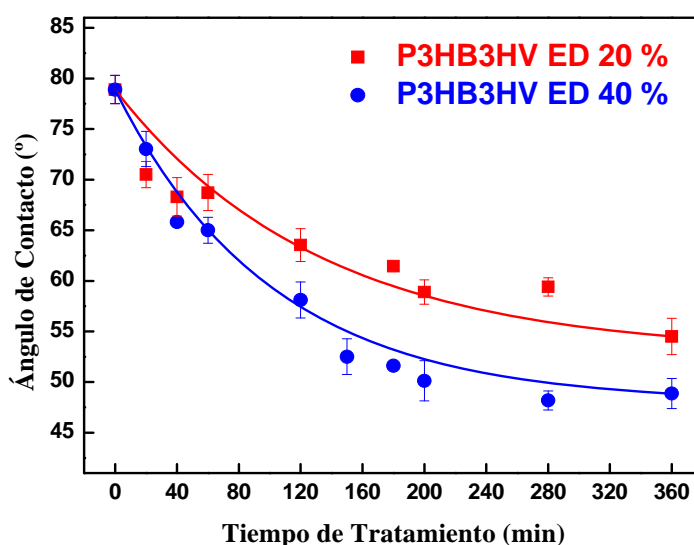


Figura II-8: Valores de ángulo de contacto de las superficies de las películas de P3HB3HV tratadas con ED medidas mediante el método de la gota estática.

Se observó un decremento continuo del ángulo de contacto con el incremento del tiempo de tratamiento, siendo este efecto más acusado para las muestras tratadas con la disolución más concentrada en ED. El tratamiento químico de los sustratos redujo el valor del ángulo de contacto un 31 % y un 39 % en relación a su valor en los sustratos sin modificar, para las muestras tratadas con ED 20 % y 40 %, respectivamente. Las medidas de ángulo de contacto para el P3HB3HV y su variación con el tiempo de tratamiento están en concordancia con los valores descritos previamente en la literatura.¹⁶

Para determinar el efecto que el tiempo de almacenamiento puede tener en la superficie de las muestras se realizó un estudio con muestras tratadas y almacenadas a temperatura ambiente durante 9 y 11 días, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura II-9.

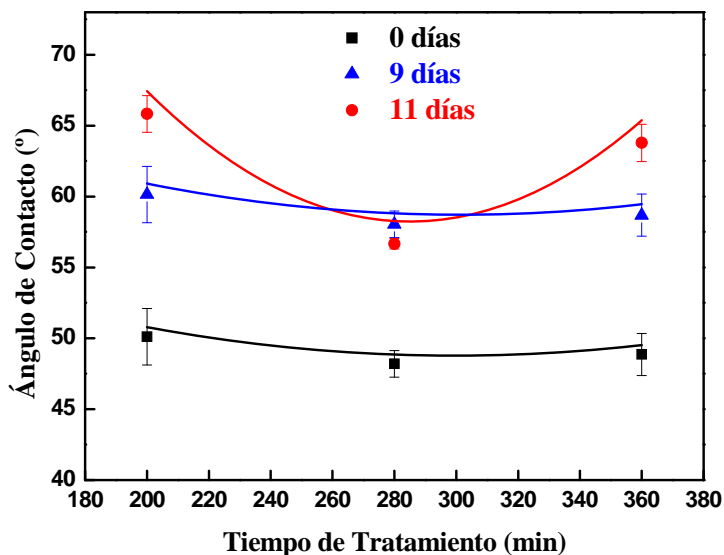


Figura II-9: Valores de ángulo de contacto en función del tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente para muestras tratadas con ED al 40 % en volumen durante distintos tiempos.

Tal y como se puede observar en la Figura II-9 existe una dependencia del ángulo de contacto en función del tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, produciéndose lo que se puede denominar efecto de envejecimiento superficial. Este efecto produce un incremento máximo en el valor del ángulo de contacto de más de 15 ° después de 11 días de envejecimiento, independientemente del tiempo de tratamiento. Este efecto, observado también en el caso de superficies tratadas con plasma,⁹ puede atribuirse a los reordenamientos macromoleculares ocurridos en la superficie de los sustratos poliméricos.

Además, la gran variabilidad de los valores de ángulo de contacto medidos en las muestras tratadas durante tiempos largos podría ser debido a factores opuestos que tienen lugar al mismo tiempo. Es decir, el tratamiento da lugar al aumento de la densidad de grupos funcionales en la superficie, pero también a un incremento en la rugosidad de la muestra.²⁵ Por lo tanto, y como consideración general para todos los tratamientos superficiales realizados, se debe tener cuidado cuando se comparan

muestras preparadas en diferentes lotes. Por esta razón, tanto en este capítulo como en los restantes, todas las medidas de ángulo de contacto se realizaron inmediatamente después del secado de las muestras.

La evaluación de la humectabilidad de las superficies también se estudió para las muestras tratadas con la disolución de NaOH 1 M, Figura II-10.

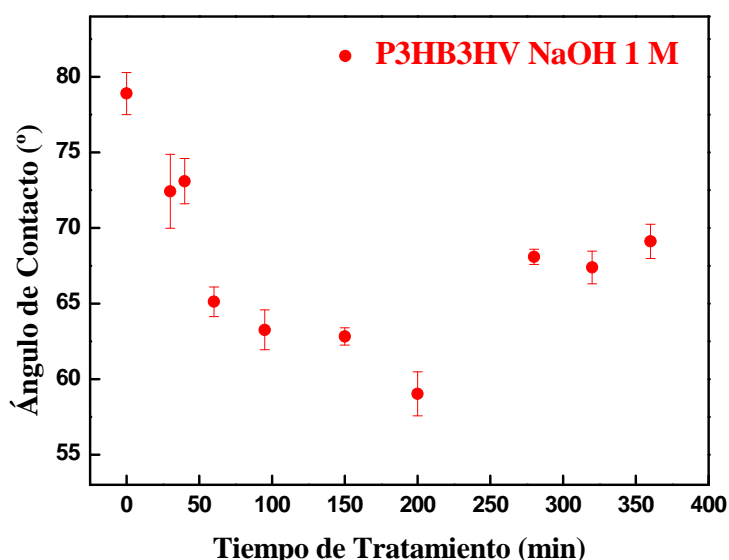


Figura II-10: Valores de ángulo de contacto en función del tiempo de tratamiento de las superficies de las películas de P3HB3HV tratadas con NaOH 1 M, medidos mediante el método de la gota estática.

Se puede observar una disminución del ángulo de contacto con el incremento del tiempo de tratamiento hasta aproximadamente 200 min, con un incremento posterior en el valor del ángulo de contacto. Esta variación puede atribuirse al aumento de la rugosidad, que según el modelo de Wenzel produciría un incremento del ángulo de contacto para superficies hidrofílicas ($\theta < 90^\circ$).²⁶ El aumento de la rugosidad puede deberse al ataque químico superficial que tiene lugar a tiempos largos de tratamiento, originando escisiones de cadena múltiples en puntos próximos que facilitan la eliminación de fragmentos de sustrato. Por tanto, se obtiene una funcionalización máxima que puede ser denominada como funcionalización de equilibrio entre los nuevos grupos funcionales producidos y la disolución de la muestra.

Comparando las figuras II-10 y II-11, se puede concluir que de modo general, los tratamientos con ED proporcionan la mayor disminución del ángulo de contacto,

alcanzando la máxima reducción en tratamientos con ED al 40%, a igualdad de tiempos de reacción. Este comportamiento se puede explicar teniendo en cuenta que en cada reacción de aminólisis puede producir la formación de tres funcionalidades hidrofílicas (amina, amida y alcohol), mientras que la hidrólisis alcalina produce sólo dos grupos hidrofílicos (ácido carboxílico y alcohol) por cada sitio de reacción.²⁷

II-3.2.2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL MEDIANTE ENSAYO DE NINHIDRINA

El proceso de aminólisis y la introducción de grupos funcionales libres en la superficie pueden ser cualitativa y cuantitativamente determinados mediante espectroscopia UV-Vis. Para ello se emplea ninhidrina como reactivo que da lugar a un pigmento púrpura en su reacción con los grupos amino. El ensayo con ninhidrina es un método muy sensible que ha sido empleado con anterioridad para evaluar la cantidad de grupos amino en las superficies poliméricas.^{16-18,28} Algunos autores¹⁸ han detectado grupos amino con este ensayo que no se han podido detectar con técnicas espectroscópicas como la espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos-X o FTIR-ATR, sugiriendo que estas técnicas podrían ser menos sensibles.

Los resultados de la evaluación cualitativa y cuantitativa del tratamiento con etilendiamina se muestran en la Figura II-11. Se observa claramente como la concentración de grupos amino es mayor en los sustratos tratados con la disolución de ED al 40 % en volumen, con un incremento progresivo dependiente del tiempo de tratamiento. El valor máximo de grupos amino es $3.37 \mu\text{mol cm}^{-2}$, obtenido al tratar durante 360 min una muestra con la disolución acuosa de ED al 40 %. Los valores obtenidos son similares a los obtenidos para tratamiento similares por otros grupos de investigación, aunque los resultados parecen depender de los reactivos empleados y del tipo de polímero.^{16,17} De este modo, en la modificación de P3HB3HV con 1,6-hexametilendiamina Wang y colaboradores¹⁶ encontraron una estabilización del ángulo de contacto después de 60 min. de tratamiento, pero un máximo de densidad de grupos amino de $0.38 \mu\text{mol cm}^{-2}$, un valor mucho menor que el obtenido en nuestro caso empleando etilendiamina. Esta diferencia puede atribuirse a la distinta reactividad de las aminas empleadas.

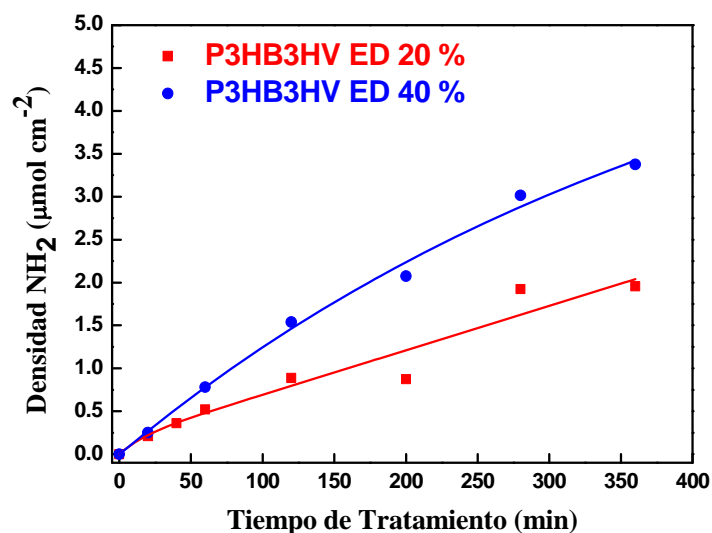
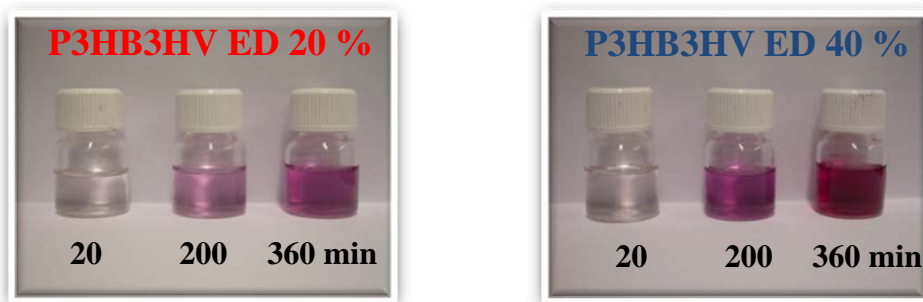


Figura II-11: Densidad superficial de grupos amino determinada mediante el ensayo de ninhidrina de las películas de P3HB3HV tratadas con ED al 20 % y 40 % en volumen. La fotografía muestra el incremento del color producido por la formación de mayor cantidad de pigmento púrpura de Ruhemann, como consecuencia de la reacción ninhidrina-grupos amino.

II-3.2.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FUORIER MEDIANTE REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA

La modificación superficial también se evaluó mediante el análisis con espectroscopia infrarroja de los sustratos. Las Figuras II-13 y II-14 muestran los espectros de infrarrojo por ATR de las muestras tratadas con disoluciones acuosas de ED al 20 y al 40 % en vol. respectivamente.

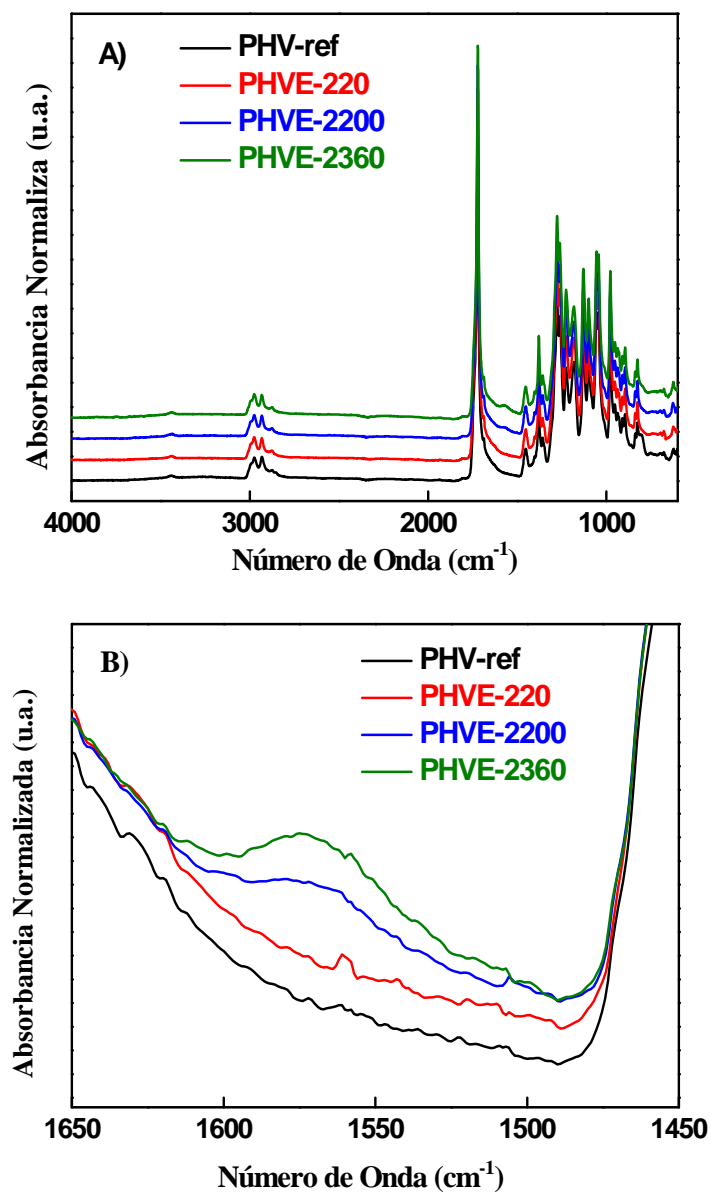


Figura II-12: Espectros normalizados de FTIR-ATR de las muestras PHV-ref, PHVE-220, PHVE-2200 y PHVE-2360 en A) todo el intervalo de medida, 4000-600 cm^{-1} (espectros desplazados en el eje y por claridad) y B) ampliación entre 1650-1450 cm^{-1} .

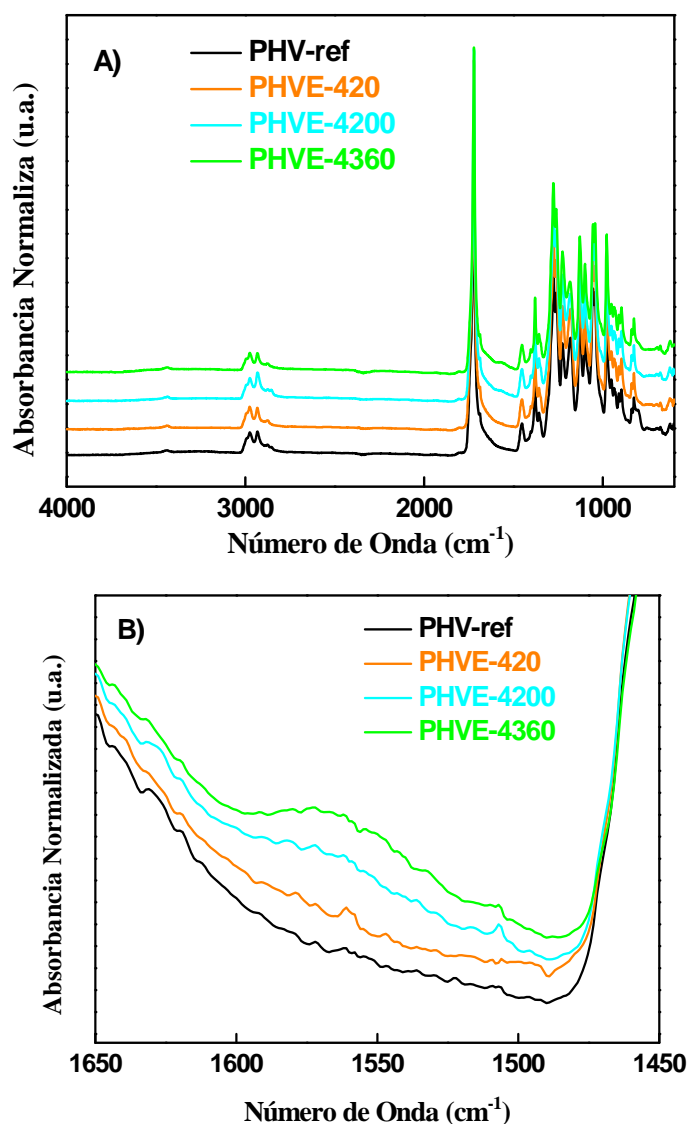


Figura II-13: Espectros normalizados de FTIR-ATR de las muestras PHV-ref, PHVE-420, PHVE-4200 y PHVE-4360 en A) todo el intervalo de medida, 4000-600 cm^{-1} (espectros desplazados en el eje y por claridad) y B) ampliación entre 1650-1450 cm^{-1} .

El tratamiento químico empleado puede producir cambios en la cristalinidad de las muestras, lo que ocasionaría variaciones en la intensidad relativa de algunas de las bandas características del P3HB3HV. A fin de evitar el efecto de los cambios de cristalinidad en la normalización de los espectros, se tomó como referencia la banda a 1382 cm^{-1} atribuida al movimiento simétrico de los grupos CH_3 del poli(3-hidroxibutirato)²⁹⁻³¹ e independiente de los cambios de cristalinidad a temperatura constante.^{9,29}

Tal y como se puede observar en las Figuras II-13 y II-14 A), los espectros son muy similares para todas las muestras. Sin embargo, en la ampliación de los espectros en la región 1650-1450 cm^{-1} (Figuras II-13 y II-14 B)) es posible observar una banda en torno a 1575 cm^{-1} , cuya intensidad aumenta con el tiempo de tratamiento para las dos concentraciones de ED empleadas. Esta banda se ha atribuido a la vibración de tijera de los grupos $-\text{NH}_2$ de los grupos amino introducidos por el tratamiento químico en fase heterogénea con etilendiamina.

Algunos autores han atribuido la aparición de una banda en torno a 1560 cm^{-1} a vibraciones asimétricas de estiramiento del COO^- de los grupos carboxílicos,⁹ siendo consecuencia de los procesos de degradación de las cadenas poliméricas. El tratamiento químico con NaOH 1 M produce la rotura de las cadenas poliméricas y la formación de nuevos grupos ácido y alcohol en la superficie polimérica. Se registraron los espectros FTIR-ATR de las muestras tratadas con NaOH 1 M a distintos tiempos. Los resultados se muestran en la Figura II-14. Los espectros obtenidos (Figura II-14 A)) son similares a los de las muestras sin tratar no pudiéndose distinguir la presencia de bandas nuevas debidas al proceso de funcionalización con NaOH, ya que dicho proceso no genera grupos funcionales nuevos, distintos de los ya existentes en la superficies poliméricas. Tal y como era esperable, tampoco se detectó la presencia de ninguna banda en la zona de 1575 cm^{-1} (Figura II-14 B)), atribuida anteriormente a la vibración de tijera de los grupos $-\text{NH}_2$. La ausencia de variaciones significativas en dicha zona del espectro sugiere que, en nuestro caso, dicha banda no es atribuible a la degradación del P3HB3HV y la nueva formación de grupos ácido y alcohol, tal y como sugieren Keen y colaboradores.⁹

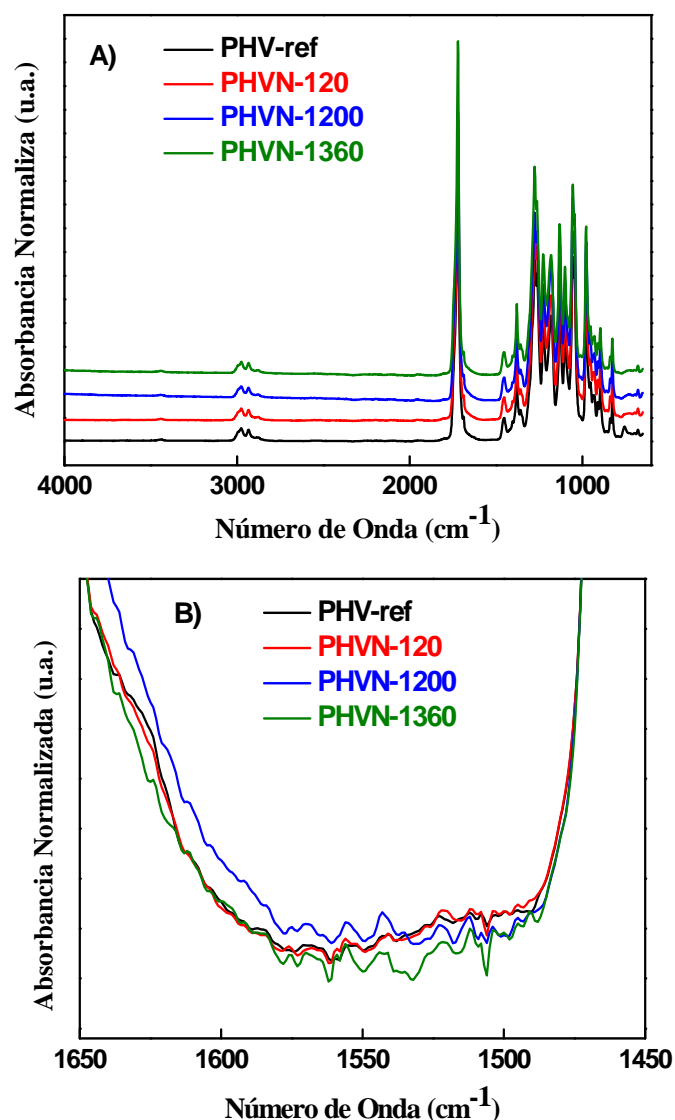


Figura II-14: Espectros normalizados de FTIR-ATR de las muestras PHV-ref, PHVN-120, PHVN-1200 y PHVN-1360 en A) todo el intervalo de medida, 4000-600 cm^{-1} (espectros desplazados en el eje y por claridad) y B) ampliación entre 1650-1450 cm^{-1} .

Como se indicó anteriormente, el tratamiento químico puede variar el grado de cristalinidad en las muestras debido a que la hidrólisis se produce preferentemente en la fase amorfa del polímero, específicamente en las regiones ricas en 3HV. La banda a 1186 cm^{-1} asociada a la fase amorfa del polímero y atribuida a la deformación de enlaces tipo $\text{C}-\text{O}-\text{C}$,²⁹⁻³² puede ser usada para estimar el índice de cristalinidad (IC) de la muestra. Es posible definir este IC^{9,29} como el cociente entre la intensidad de la banda a 1382 cm^{-1} , banda asociada con la fase cristalina del polímero, pero cuya intensidad es independiente de la cristalinidad de la muestra cuando se trabaja a temperatura

constante, y la intensidad de la banda a 1186 cm^{-1} , relacionada con la fase amorfa del mismo. La Tabla II-2 presenta los valores de IC para las muestras de P3HB3HV sin modificar (referencia) y tratadas con ED y NaOH.

Tabla II-2: Valores del índice de cristalinidad calculados a partir de la intensidad relativa de las bandas a 1382 cm^{-1} y 1186 cm^{-1} , para el P3HB3HV sin tratar, tratado con ED y con NaOH.

Muestra	Índice de Cristalinidad (IC)
PHV-ref	0.655
PHVE-220	0.669
PHVE-2200	0.713
PHVE-2360	0.740
PHVE-420	0.674
PHVE-4200	0.759
PHVE-4360	0.829
PHVN-120	0.558
PHVN-1200	0.508
PHVN-1360	0.595

Si bien el índice de cristalinidad no puede ser tomado como una medida cuantitativa del grado de cristalinidad de las muestras, sí que puede ser tenido en cuenta en términos comparativos. Así, es posible observar que el índice aumenta progresivamente con el tiempo de tratamiento para las muestras tratadas con ED. Este aumento en el índice de cristalinidad, indicativo del aumento relativo del grado de cristalinidad con el tiempo de tratamiento, puede atribuirse a la mayor reactividad de las partes amorfas y su disolución durante el tratamiento, produciendo un incremento en la cristalinidad de las muestras.

Siempre de modo comparativo, sería posible determinar que los tratamientos con disoluciones más concentradas de ED (40 % en volumen) dan lugar a un mayor incremento de la cristalinidad, tal y como puede deducirse de los índices de cristalinidad determinados por FTIR-ATR y mostrados en la Tabla II-2. En el caso del tratamiento con NaOH no se observó relación entre el índice de cristalinidad y el tiempo de tratamiento.

II-3.2.4. ANÁLISIS ELEMENTAL

La modificación química con ED debe variar de modo sustancial la relación de grupos funcionales presentes en las películas de polímero. De acuerdo con la reacción

química producida (Figura II-4), el tratamiento químico con ED debe modificar la relación de elementos en las muestras, incrementando el porcentaje de N, H y C y disminuyendo el de O. Para determinar esta posible variación, las muestras tratadas con ED se analizaron mediante microanálisis, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura II-15.

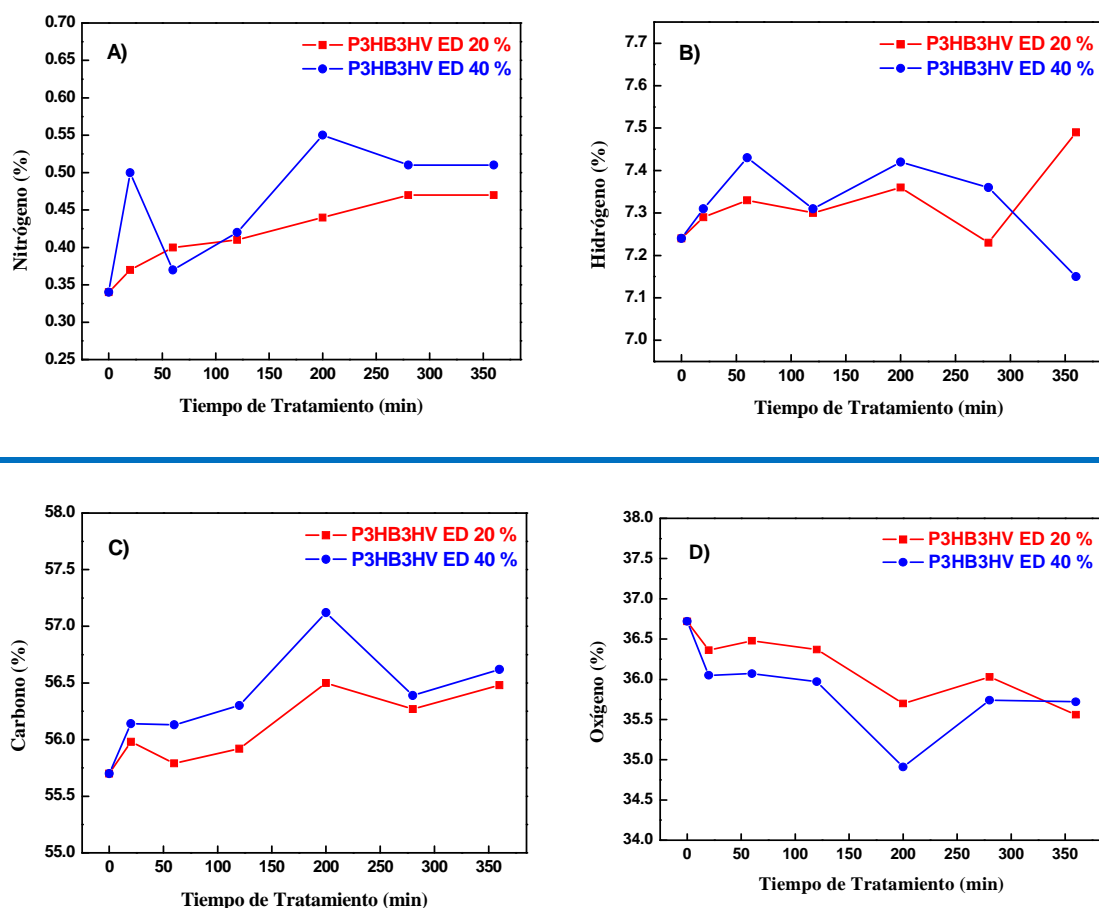


Figura II-15: Variación del porcentaje de elementos químicos A) N, B) H, C) C y D) O, en las películas de P3HB3HV tratadas con disolución acuosa de ED al 20 % y al 40 % en volumen durante distintos tiempos.

En las muestras tratadas con ED, la tendencia general observada para los cuatro elementos analizados es la esperada teniendo en cuenta la reacción química producida, con aumentos en las cantidades de N, H y C y reducción en la cantidad relativa de O. Sin embargo, las muestras tratadas con ED al 40 % en volumen presentan un comportamiento más aleatorio, observándose mucha dispersión en los resultados.

De modo comparativo, el análisis elemental muestra las diferencias entre los distintos tratamientos. Así, se observan los mayores incrementos en los porcentajes de N, H y C para las muestras tratadas con la disolución más concentrada en ED, tal y como cabría esperar. De igual modo, la reducción en el porcentaje relativo de O es mayor cuanto mayor es la concentración de amina empleada.

II-3.2.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El tratamiento químico en fase heterogénea, además de la introducción de grupos funcionales específicos en la superficie polimérica, puede producir una degradación superficial. Esta degradación puede dar lugar a un aumento de la rugosidad, lo que puede influir en los valores del ángulo de contacto (tal y como se ha sugerido en el apartado II-3.2.1.) y, consecuentemente, en la adhesión celular.

La Figura II-16 muestra las imágenes obtenidas con microscopía electrónica de barrido de las superficies correspondientes a sustratos tratados con ED y NaOH y el polímero sin tratamiento empleado como referencia. En general, no se observaron grandes cambios en la superficie de las películas en función del tipo y duración del tratamiento químico. El aspecto general de las muestras tratadas es similar al de la referencia (Figura II-16 a)), sin que el tratamiento químico de lugar a orificios, fracturas o surcos en las muestras observadas.

Si parece observarse un incremento en la rugosidad superficial a tiempos de tratamiento largos, especialmente cuando el sustrato es tratado con la disolución acuosa de ED al 40 % en volumen (PHVE-4200), Figura II-16 e), indicativo de la degradación producida por tratamientos prolongados.

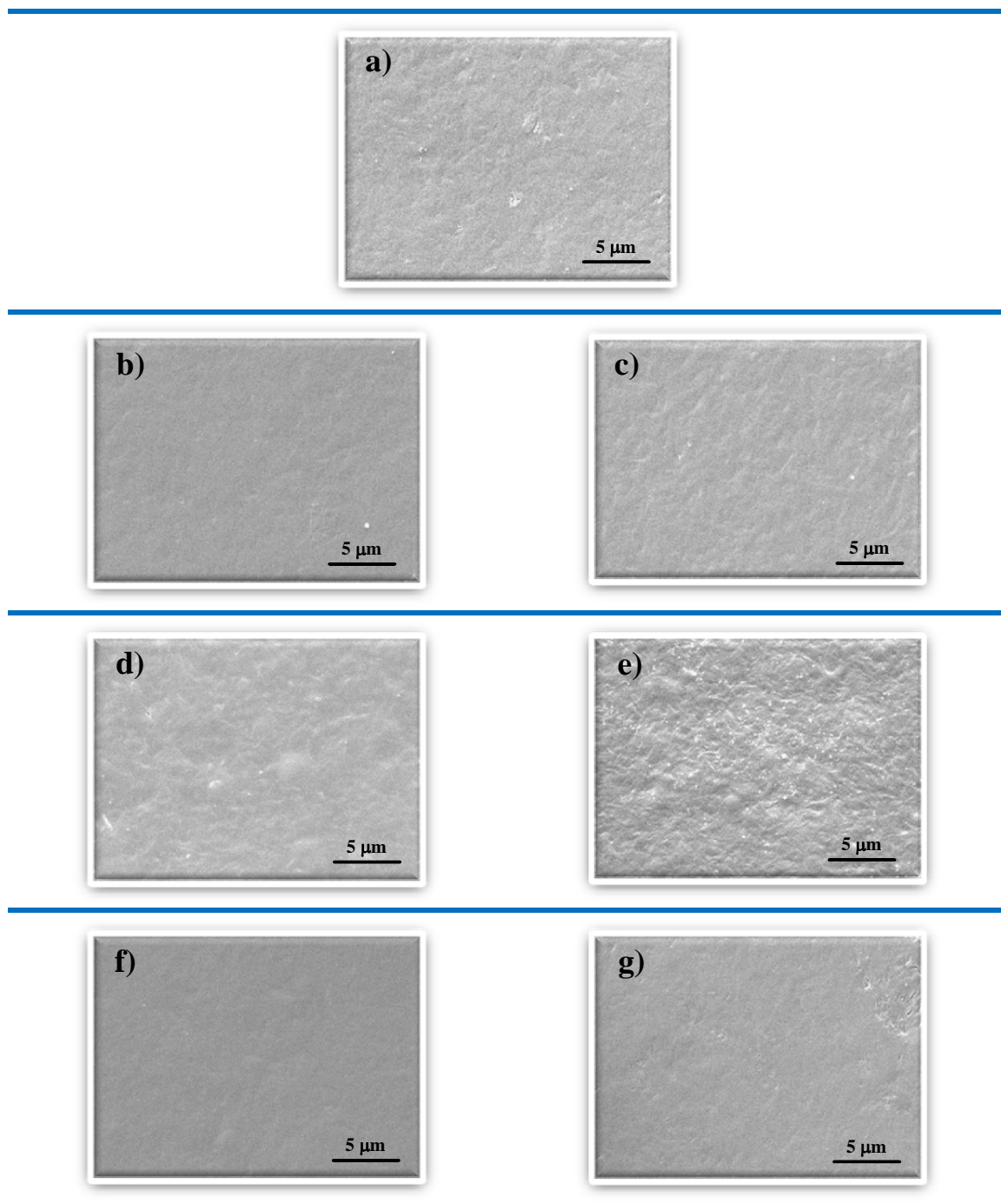


Figura II-16: Imágenes de SEM a 5000X de las muestras a) PHV-ref, b) PHVE-220, c) PHVE-2200, d) PHVE-420, e) PHVE-4200, f) PHVN-120 y g) PHVN-1200.

II-3.2.7. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS PELÍCULAS MEDIANTE ENSAYOS MECÁNICOS

En estudios previos se observó que las propiedades mecánicas de las películas de P3HB3HV sin tratar eran adecuadas para su uso en la sustitución de tejido vesical.

Además, su comportamiento mecánico fue optimizado variando su espesor (entre 40 y 80 micras) y, al mismo tiempo, manteniendo la flexibilidad requerida de la película. No obstante, se comprobó que su aplicabilidad estaba limitada por la alta hidrofobicidad de los sustratos y así como la carencia de grupos funcionales reactivos; específicamente, se observó que la proliferación celular e integración con el tejido adyacente *in vivo* eran deficientes. Alternativamente, es posible mejorar el comportamiento biológico de estos sustratos mediante un tratamiento químico superficial, aunque esto conlleva un inevitable deterioro de sus propiedades mecánicas.

Tabla II-3: Valores de módulo de Young, E , y esfuerzo máximo de tracción, $\sigma_{m\acute{a}x}$, de las muestras tratadas con ED al 40 % en volumen durante distintos tiempos, determinados mediante ensayo de desgarro de simulación de sutura.

Muestra	$\sigma_{m\acute{a}x}$ (MPa)	E (MPa)
PHV-ref	3.710	0.028
PHVE-440	2.909	0.029
PHVE-480	2.676	0.035
PHVE-4120	2.112	0.040

A la vista de los resultados obtenidos y mostrados en la Tabla II-3, es posible concluir que el módulo elástico se incrementa ligeramente con los tratamientos con ED; un 6 % para tratamientos de 40 min y alrededor del 10 % para tratamientos más largos.

En segundo lugar, la elongación a rotura disminuye con el incremento del tiempo de tratamiento, variando desde el valor de 4.8 % para la muestra sin tratar, hasta 3.0, 1.6 y 0.8 % para las muestras modificadas con ED durante 40, 80 y 120 min, respectivamente. La pérdida de propiedades mecánicas de las películas con el incremento del tiempo de tratamiento se puede atribuir a la degradación del polímero (escisión de cadenas) por la reacción de aminólisis. Esta degradación se produce de modo preferencial en las regiones amorfas, dando lugar a sustratos más rígidos (valores de módulo mayores) y al mismo tiempo, más frágiles.

II-3.2.8. VISCOSIMETRÍA

Los resultados de los ensayos de esfuerzo-deformación muestran una pérdida de propiedades mecánicas de las muestras después del tratamiento químico, incluso cuando el tiempo de tratamiento es de solo 40 minutos. Esta degradación se ha atribuido a la

rotura de las cadenas poliméricas, lo que daría como resultado una disminución del peso molecular de los polímeros. Así, mediante el estudio de la viscosidad intrínseca de las muestras se pretendió determinar la influencia del tratamiento químico en el peso molecular de los sustratos.

La Figura II-17 muestra la viscosidad reducida (η_{red}) del P3HB3HV para determinados tratamientos con ED y NaOH previamente seleccionados, en una representación típica de Huggins. A partir de la extrapolación a concentración cero de la viscosidad reducida es posible obtener el valor de la viscosidad intrínseca (η) de cada muestra. La viscosidad intrínseca depende de la naturaleza pero no de la concentración de soluto y puede escribirse como:

$$[\eta] \equiv \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c} \quad [1]$$

donde c es la concentración de soluto y η_0 la viscosidad del disolvente. La relación entre la viscosidad intrínseca y el peso molecular se obtiene a mediante el empleo de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = K M^a \quad [2]$$

siendo K y a constantes características del polímero, disolvente empleado y temperatura de trabajo. A partir de la ecuación 2 y de las constantes determinadas por Akita y colaboradores²³ para el P3HB ($K = 1.18$ y $a = 0.78$), es posible relacionar la viscosidad intrínseca, determinada a partir de medidas de viscosimetría, con el peso molecular del polímero estudiado, P3HB3HV.

Se puede observar en la Figura II-17 que la viscosidad y, consecuentemente, el peso molecular de las películas de P3HB3HV, disminuye a medida que aumenta el tiempo de tratamiento, siendo la reducción más significativa para las películas tratadas con ED, sugiriendo que este tratamiento es el más agresivo.

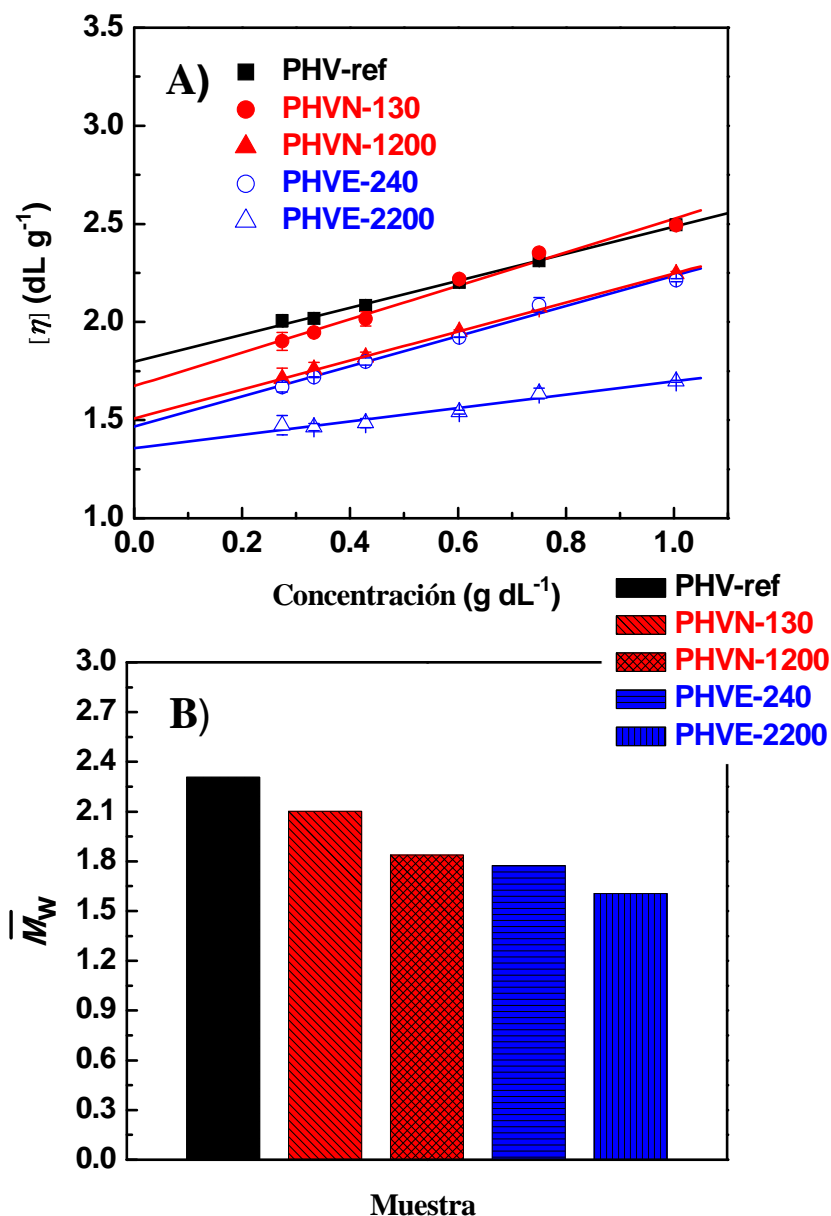


Figura II-17: Representación de viscosidad reducida (η_{red}) en función de la concentración A) y variación del peso molecular medio B), para el PHV-ref, PHVE-240, PHVE-2200, PHVN-130 y PHVN-1200.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis, anteriormente apuntada, de que el tratamiento químico de los sustratos produce una rotura de las cadenas poliméricas, reduciendo el peso molecular a medida que aumenta el tiempo de tratamiento y, en consecuencia, deteriorando sus propiedades mecánicas. La degradación ocurre de modo preferencial en las regiones amorfas proporcionando películas más rígidas y, al mismo tiempo, más frágiles, tal y como se demostró en el estudio de las propiedades mecánicas.

II-3.3. EVALUACIÓN DE LA UNIÓN COVALENTE DEL FRAGMENTO PEPTÍDICO DE LAMININA YIGSR

El deterioro de las propiedades mecánicas, puesto de manifiesto durante la caracterización y evaluación del proceso de funcionalización química de las películas (apartado II-3.2.) de P3HB3HV, podría ser mitigado con un incremento del espesor de las muestras, pero esto daría un material demasiado rígido. Por tanto, para la unión covalente del fragmento peptídico de laminina (YIGSR) (Figura II-18), se buscó un compromiso entre la modificación superficial, el espesor de las muestras y las propiedades mecánicas. Así, se seleccionaron las muestras PHVE-240 (tratada con ED al 20 % en volumen durante 40 minutos) y PHVN-130 (tratada con NaOH 1 M durante 30 minutos) para realizar la unión covalente de YIGSR y los estudios celulares posteriores.

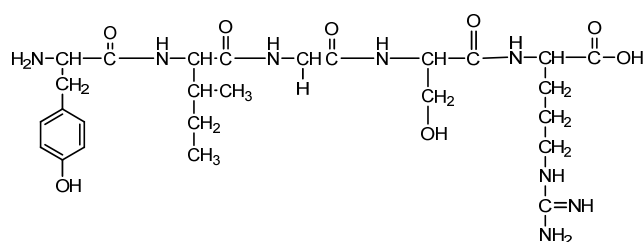


Figura II-18: Estructura química del fragmento peptídico de laminina YIGSR.

La funcionalización de los sustratos de P3HB3HV con $-NH_2$ y $-COOH$ no sólo modifica la hidrofiliidad de los sustratos, si no que también proporciona grupos funcionales que pueden ser empleados para unir moléculas bioactivas como el fragmento peptídico de laminina YIGSR. Tal y como se ha indicado anteriormente, este fragmento obtenido de la cadena B1 de laminina ha demostrado ser un fragmento funcionalmente activo para la adhesión, proliferación y crecimiento celular.³³ El fragmento YIGSR se unió covalentemente a los sustratos de P3HB3HV mediante la química de la carbodiimida,^{3,34} de acuerdo con el esquema de la Figura II-5. Seguidamente, se midió el ángulo de contacto de los sustratos modificados con YIGSR (Tabla II-4), a fin de evaluar las variaciones en la hidrofobicidad de las películas debidas a dicha modificación.

Tabla II-4: Valores de ángulo de contacto y densidad de grupos amino por unidad de superficie, en los sustratos tratados con YIGSR y las películas empleadas como referencia en cada caso.

Muestra	Ángulo de Contacto (°)	Concentración de Grupos NH ₂ (μmol cm ⁻²)
PHV-ref	78.9 ± 1.4	0.000
PHVE-240	68.3 ± 1.9	0.361
PHVE-240-YIGSR	69.8 ± 1.1	0.350
PHVN-130	73.1 ± 1.5	0.000
PHVN-130-YIGSR	73.0 ± 1.6	0.138

Los análisis ANOVA de una vía mostraron que hay diferencias significativas entre en los valores del ángulo de contacto para los distintos tratamientos (ED o NaOH) ($p < 0.001$). El test de Tukey *post hoc* realizado para comparar las muestras, mostró, con un nivel de 0.001, que todos los tratamientos químicos alteran el ángulo de contacto de modo significativo respecto al PHV-ref. El test de Tukey también mostró que los ángulos de contacto de las superficies de PHVE-240 y PHVE-240-YIGSR son similares ($p < 0.05$). El mismo resultado se encontró al comparar PHVN-130 y PHVN-130-YIGSR. Estos resultados sugieren que la unión covalente de YIGSR no modifica aparentemente la hidrofobicidad de las superficies pretratadas con ED y NaOH.

El ensayo de ninhidrina fue empleado para determinar la unión del fragmento peptídico YIGSR a la superficie, mostrándose en la Tabla II-4 la concentración de grupos amino estimada. Por una parte, se observó que en las películas tratadas con ED y posteriormente con YIGSR (estructura en Figura II-18), la concentración de grupos amino no varía significativamente. Esto puede ser atribuido a la presencia de grupos amino en el péptido. Estos grupos compensan la pérdida de los grupos amino de la superficie que reaccionan con los grupos carboxilo del péptido, no alterando significativamente el número de grupos amino libres que reaccionan con la ninhidrina.

Por otra parte, la película tratada con NaOH y YIGSR presenta una cantidad significativa de grupos amino. Teniendo en cuenta que el sustrato modificado con NaOH inicialmente no presentó grupos amino, la señal detectada mediante el ensayo de ninhidrina puede ser asociada a los fragmentos YIGSR unidos a la superficie del poliéster.

II-3.4. ENSAYOS CELULARES DE LOS SUSTRATOS DE P3HB3HV MODIFICADOS

El efecto de los tratamientos químicos en la interacción entre sustrato y células se estudió en muestras tratadas con disolución acuosa de ED al 40 % en volumen durante 40, 80 y 120 min. Los resultados se ilustran en la Figura II-19 A).

Se observó que los tratamientos cortos con ED, a 40 min por ejemplo, no incrementan el número de células adheridas a la superficie del P3HB3HV, incluso si estos tratamientos reducen la hidrofobicidad de las superficies. Para tiempos de tratamiento más largos, parece observarse un incremento de las células adheridas a las 4 h de estudio. El test de una vía de ANOVA realizado para comparar la significancia estadística del tiempo de tratamiento mostró que tras 4 h, el tratamiento con ED influenció la adhesión celular ($p < 0.001$). Se realizó un test de Tukey para comparar las diferencias entre cada par de medidas, correspondientes a cada tiempo de tratamiento. Los resultados demostraron una diferencia para tiempos de tratamiento largos (120 min) respecto a la película de referencia (PHV-ref).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en las muestras correspondientes a 8 h de cultivo reveló que: i) el tratamiento con ED durante 40 min es definitivamente peor que los otros dos y ii) para tratamientos a tiempos largos, no existen diferencias significativas entre los sustratos tratados y PHV-ref.

En la Figura II-19 B), se representa la adhesión celular para las muestras tratadas con NaOH 1 M. A la vista de los resultados parece que ni el tratamiento a menor tiempo ni el más largo, mejoran la adhesión celular. Los resultados parecen indicar que los mejores resultados se obtuvieron con un tiempo de tratamiento intermedio (60 min). El test ANOVA de una vía empleado para determinar la existencia de diferencias significativas entre los distintos tiempos de tratamiento, mostró que los tratamientos con NaOH también ejercen influencia en la adhesión celular ($p < 0,001$). El test de Turkey *post hoc* mostró que el tratamiento durante 60 min (PHVN-160) incrementa la adhesión celular después de 4 h de cultivo, pero que los resultados correspondientes a 8 h de cultivo no son significativamente diferentes de los obtenidos para las películas de P3HB3HV sin tratar (PHV-ref).

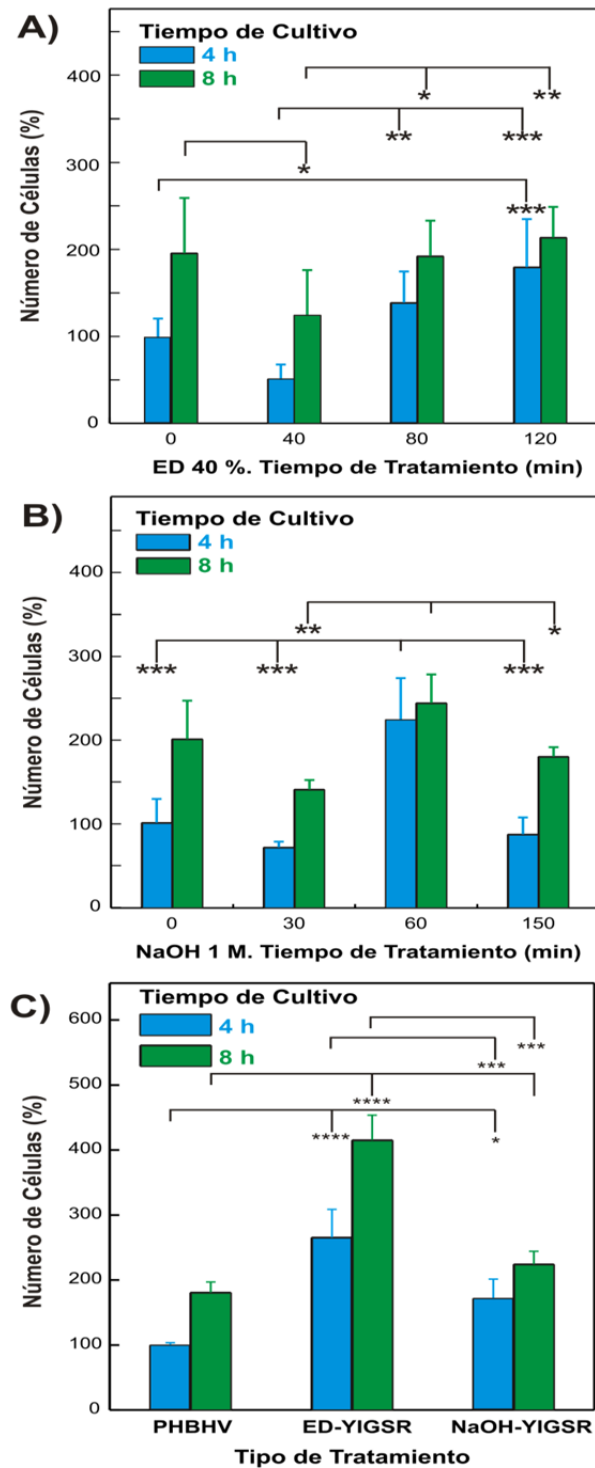


Figura II-19: Adhesión celular a 4 h y 8 h, en PHV-ref y modificado con A) ED 40 % durante 40, 80 y 120 min, B) NaOH 1 M durante 30, 60 y 150 min y C) tratados con ED y YIGSR y con NaOH y YIGSR. Los valores representan las medida \pm la desviación estándar. Significación estadística (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) determinada mediante ANOVA de una vía con análisis de Tukey *post hoc*.

Asimismo, se estudió la influencia que la unión covalente del fragmento peptídico de laminina YIGSR en los sustratos tratados con ED (PHVE-240-YIGSR) y con NaOH (PHVN-130-YIGSR) puede tener en la adhesión celular, mostrándose los resultados en la Figura II-19 C). El test ANOVA de una vía determinó la influencia significativa ($p < 0.001$) de esta unión en la adhesión celular. En los dos casos, se puede observar que la unión covalente del pentapéptido a las superficies aumenta la adhesión celular tras 4 h de cultivo celular. Sin embargo, después de 8 h de cultivo, la comparación de las medias usando el test de Tukey indicó que sólo la muestra PHVE-240-YIGSR experimenta un claro incremento de la adhesión celular comparado con PHV-ref. Además, el test de Tukey indicó que la adhesión celular es en PHVE-240-YIGSR es significativamente superior a la adhesión celular en PHVN-130-YIGSR.

II-3.5. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA CELULAR EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO REALIZADO A LAS PELÍCULAS DE P3HB3HV

La microscopía electrónica de barrido permitió el estudio de la morfología celular después del sembrado en sustratos de P3HB3HV con distintos tratamientos, aportando información sobre la citocompatibilidad de los sustratos.

La observación de las muestras después de 4 h de cultivo (Figura II-20 columna izquierda), reveló que las células adheridas a PHV-ref (Figura II-20 a) muestran una morfología esférica. Es posible observar células esféricas sin extensiones filopódicas, lo que sugiere una pobre interacción celular con el sustrato polimérico. La hidrofobicidad del sustrato ($CA = 78^\circ$), unido a la falta de funcionalidades superficiales puede ser el motivo de este comportamiento.

La Figura II-20 b) muestra la imagen SEM de las células sembradas en PHVE-4120 después de 4 h de cultivo. En este sustrato, tal y como se ha determinado (Figura II-19 A), se produce un incremento en la interacción células-sustrato. De hecho, las células muestran una morfología menos esférica en comparación con PHV-ref y la mayoría de ellas presentan extensiones filopódicas, indicativo de una mejora en la interacción con el sustrato. Además, se observó un incremento en el número y tamaño de las colonias celulares. Este comportamiento se puede atribuir a la disminución del ángulo de contacto después del tratamiento con ED.

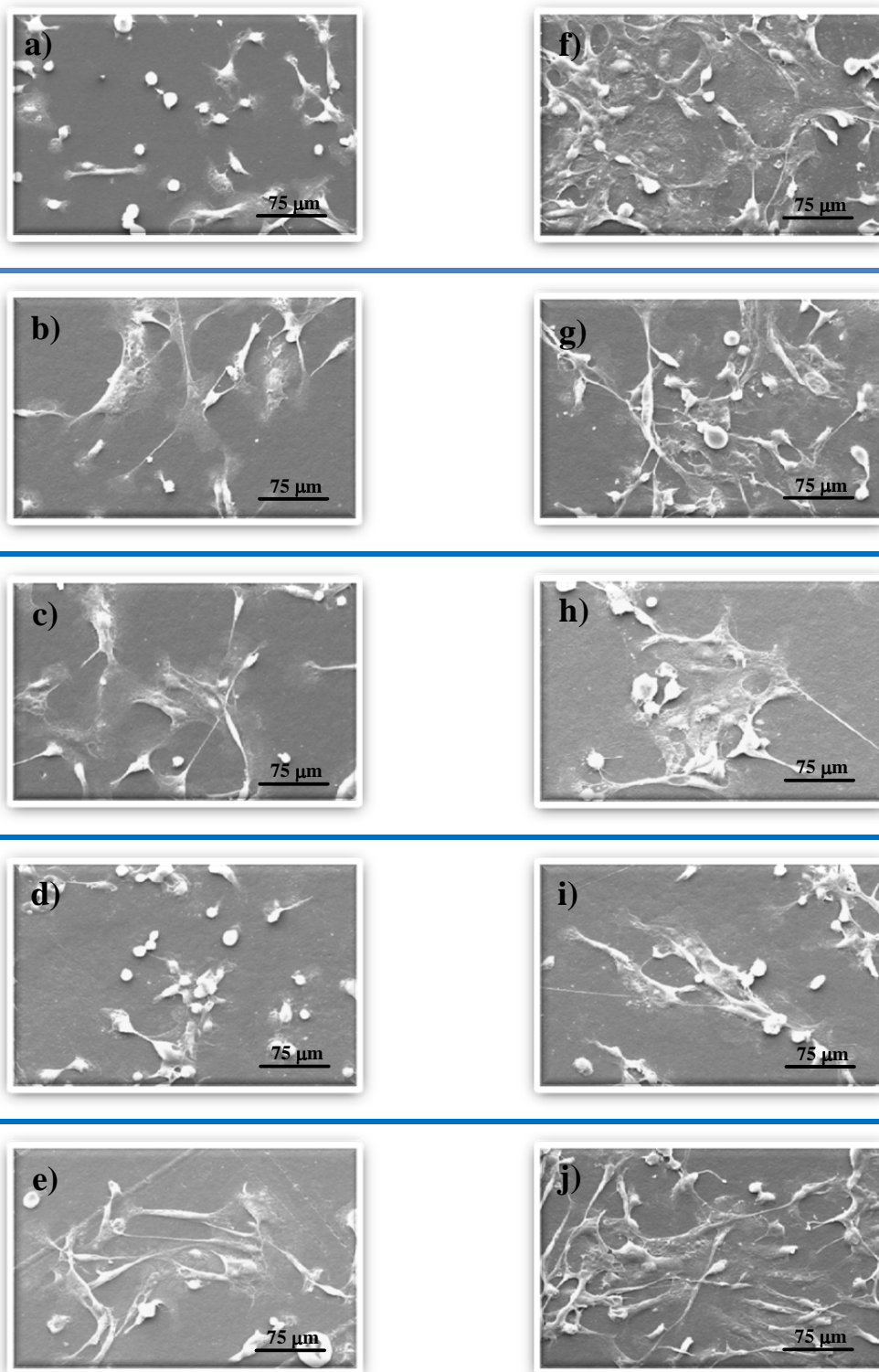


Figura II-20: Fotografías de SEM de células uroteliales porcinas tras 4 h de cultivo (columna izquierda, a-e) y 8 h de cultivo (columna derecha, f-j) sembradas en: a,f) películas de PHV-ref, b,g) películas de PHVE-2120, c,h) películas de PHVN-130, d,i) películas de PHVN-1150 y e,f) películas de PHV-240-YIGSR.

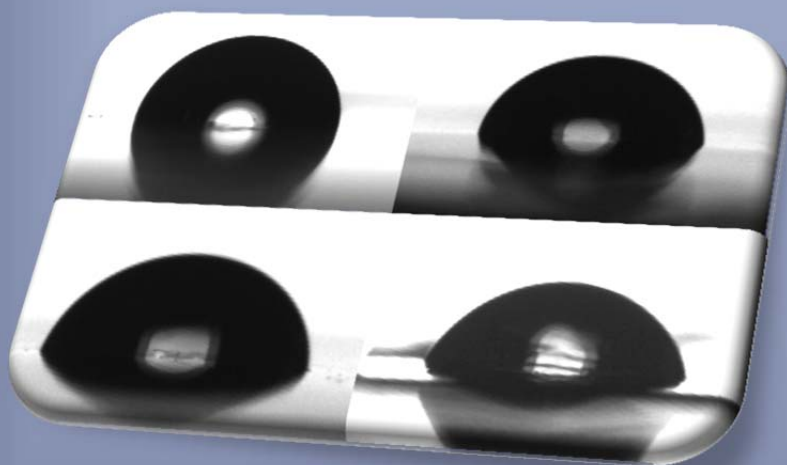
Imágenes representativas de SEM de los sustratos PHVN-160 y PHVN-1150 se muestran en la Figura II-20 c,d). La morfología celular observada en estas muestras está en concordancia con la determinación cuantitativa mostrada en la Figura II-19 b). Las muestras tratadas durante 60 min presentan una mejor interacción células-sustrato que aquellas modificadas durante tiempos más largos, observándose un mayor número de células con morfología esferoide, sin extensiones filopódicas (Figura II-20 d)). En este caso, los resultados de las medidas de ángulo de contacto no proporcionan una explicación plausible para este fenómeno, ya que ambos tratamientos reducen significativamente el ángulo de contacto (Figura II-10). Una hipótesis más adecuada para explicar este comportamiento sería atribuir las diferencias en comportamiento a la existencia de fuerzas electrostáticas repulsivas entre las células y los sustratos de P3HB3HV. Hay que considerar que al pH del medio de cultivo, los grupos carboxilo generados por los tratamientos con NaOH se cargan negativamente y las membranas celulares también presentan cargas negativas asociadas a los residuos del ácido siálico.

La morfología celular en los sustratos de tratados con ED y YIGSR (PHVE-140-YIGSR) se muestra en la Figura II-20 e). Esta imagen muestra como, en este sustrato, las células parecen ser capaces de organizar una matriz extracelular y guiar la formación de redes mediante fuerzas de atracción celulares. Estos resultados corroboran los resultados cuantitativos descritos previamente (Figura II-19 c)).

Los resultados del estudio de la interacción células-sustrato después de 8 h de cultivo se pueden observar en la Figura II-20, columna derecha. Para las muestras tratadas sólo con ED y NaOH (Figura II-20 g-i)), se confirman los resultados obtenidos con anterioridad, pudiéndose concluir que no existe un incremento significativo de la adhesión celular, ni un cambio sustancial en la morfología celular con respecto a las células observadas en el sustrato de referencia. Sin embargo, el sustrato PHVE-240-YIGSR (Figura II-19 j)) todavía exhibe una mejor interacción con las células uroteliales porcinas, tal y como se determinó para el estudio a 4 h. El sustrato PHVE-240-YIGSR muestra un incremento en la interacción células-sustrato, caracterizado por un aumento de la cantidad de células adheridas y la morfología plana con extensiones filopódicas observadas, aunque la disminución del ángulo de contacto por el tratamiento no es muy marcada Figura II-8.

II-4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) McDougal, W. S. *Journal of Urology* **1992**, 147, 1199.
- (2) Soergel, T. M.; Cain, M. P.; Misseri, R.; Gardner, T. A.; Koch, M. O.; Rink, R. C.; Strand, W.; Austin, P.; Shortliffe, L.; Diamond, D.; Park, J. *Journal of Urology* **2004**, 172, 1649.
- (3) Atala, A.; Bauer, S. B.; Soker, S.; Yoo, J. J.; Retik, A. B. *Lancet* **2006**, 367, 1241.
- (4) Miller, D. C.; Thapa, A.; Haberstroh, K. M.; Webster, T. J. *IEEE Transactions on Nanobioscience* **2002**, 1, 61.
- (5) Rohman, G.; Pettit, J. J.; Isaure, F.; Cameron, N. R.; Southgate, J. *Biomaterials* **2007**, 28, 2264.
- (6) Thapa, A.; Webster, T. J.; Haberstroh, K. M. 2002; Vol. 711, p 205.
- (7) Thapa, A.; Webster, T. J.; Haberstroh, K. M. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2003**, 67, 1374.
- (8) Negrete, H. O.; Lavelle, J. P.; Berg, J.; Lewis, S. A.; Zeidel, M. L. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology* **1996**, 271, F886.
- (9) Keen, I.; Broota, P.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Trau, M.; Grøndahl, L. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 427.
- (10) Bisson, I.; Hilborn, J.; Wurm, F.; Meyrat, B.; Frey, P. *Urology* **2002**, 60, 176.
- (11) Bisson, I.; Kosinski, M.; Ruault, S.; Gupta, B.; Hilborn, J.; Wurm, F.; Frey, P. *Biomaterials* **2002**, 23, 3149.
- (12) Hudson, A. E.; Carmean, N.; Bassuk, J. A. *Tissue Engineering* **2007**, 13, 2219.
- (13) Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H. *Biomaterials* **2003**, 24, 4385.
- (14) Bramfeldt, H.; Vermette, P. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2009**, 88, 520.
- (15) Santiago, L. Y.; Nowak, R. W.; Rubin, J. P.; Marra, K. G. *Biomaterials* **2006**, 27, 2962.
- (16) Wang, L. Y.; Wang, Y. J.; Cao, D. R. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* **2009**, 46, 765.
- (17) Zhang, H.; Hollister, S. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2009**, 20, 1975.
- (18) Zhu, Y.; Gao, C.; Liu, X.; Shen, J. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1312.
- (19) Zhu, Y.; Gao, C.; Liu, Y.; Shen, J. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2004**, 69, 436.
- (20) Chun, S. Y.; Lim, G. J.; Kwon, T. G.; Kwak, E. K.; Kim, B. W.; Atala, A.; Yoo, J. J. *Biomaterials* **2007**, 28, 4251.
- (21) Kendall, P. A. *Nature* **1963**, 197, 1305.
- (22) Joullie, M. M.; Thompson, T. R.; Nemeroff, N. H. *Tetrahedron* **1991**, 47, 8791.
- (23) Akita, S.; Einaga, Y.; Miyaki, Y.; Fujita, H. *Macromolecules* **1976**, 9, 774.
- (24) Goddard, J. M.; Hotchkiss, J. H. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2007**, 32, 698.
- (25) France, R.; Short, R. *J Chem Soc Faraday Trans* **1997**, 93, 5.
- (26) Dorrer, C.; Rühle, J. *Soft Matter* **2009**, 5, 51.
- (27) Croll, T. I.; O'Connor, A. J.; Stevens, G. W.; Cooper-White, J. J. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 463.
- (28) Yu, H.; Wang, W.; Chen, X.; Deng, C.; Jing, X. *Biopolymers* **2006**, 83, 233.
- (29) Galego, N.; Rozsa, C.; Sánchez, R.; Fung, J.; Analía, V.; Santo Tomás, J. *Polymer Testing* **2000**, 19, 485.
- (30) Hong, S. G.; Chen, W. M. *E-Polymers* **2006**, 1.
- (31) Xu, J.; Guo, B. H.; Yang, R.; Wu, Q.; Chen, G. Q.; Zhang, Z. M. *Polymer* **2002**, 43, 6893.
- (32) Kansiz, K.; Billman-Jacobe, H.; McNaughton, D. *Applied and Environmental Microbiology* **2000**, 66, 3415.
- (33) Massia, S. P.; Rao, S. S.; Hubbell, J. A. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 8053.
- (34) Valeur, E.; Bradley, M. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, 606.



III-EMPLEO DE COPOLÍMEROS DE P3HB3HH_x PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO UROTELIAL

El desarrollo de una metodología robusta en el capítulo II para la modificación de los sustratos de P3HAs permite su utilización en otros copolímeros de P3HB. Teniendo en cuenta el mejor comportamiento mecánico de los copolímeros de P3HB3HH_x con respecto al de los copolímeros P3HB3HV, se consideró que su uso en el diseño de tejido vesical podría ser ventajoso. Películas y andamios de P3HB3HH_x se modificaron superficialmente y fueron analizadas para determinar su aplicabilidad en la regeneración de tejido urotelial.

III-1- INTRODUCCIÓN

III-1.1. POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-*co*-3-HIDROXIHEXANOATO), UN POLIHIDROXIALCANOATO DE NUEVA GENERACIÓN

Dentro de la familia de los PHAs (polímeros biodegradables y semicristalinos producidos por una gran cantidad de bacterias y microorganismos)^{1,2}, el efecto de envejecimiento de sus miembros más representativos, el P3HB y P3HB3HV, produce un notorio aumento de la fragilidad de estos materiales,³⁻⁶ tal y como ha sido puesto de manifiesto en el capítulo II. Por tanto, y a pesar de los buenos resultados obtenidos en los ensayos con células uroteliales porcinas,⁷ su rigidez y fragilidad hacen necesaria la búsqueda de un material químicamente similar, pero mecánicamente más apto para la regeneración de tejido urotelial.

En este sentido, para mejorar las propiedades mecánicas del P3HB mediante la reducción de su cristalinidad, se han desarrollado un gran número de copolímeros, especialmente mediante la producción de P3HAs de longitud de cadena media. Entre todos ellos, el poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxihexanoato) (P3HB3HHx), presenta propiedades muy prometedoras para su aplicación en ingeniería de tejidos.^{1,8,9}

Los grupos propilo de las cadenas laterales del monómero 3HHx proporcionan al polímero propiedades diferentes a las del homopolímero P3HB, reduciendo la temperatura de fusión y la cristalinidad de los copolímeros y, por tanto, aumentando significativamente la elasticidad de los substratos preparados con 3HHx con respecto a la del homopolímero P3HB.¹⁰

Al igual que para el resto de copolímeros, sus propiedades son función de la relación monomérica de sus copolímeros constituyentes. De hecho, la cristalización secundaria observada para el P3HB y el P3HB3HV es prácticamente suprimida cuando la fracción molar de 3HHx es superior al 10 %.¹⁰ Además de tener buenas propiedades mecánicas, los copolímeros P3HB3HHx presentan una serie de propiedades interesantes, como la biodegradación anaerobia y aerobia, la digestión alcalina en caliente, la estabilidad hidrolítica, buen olor y buenas propiedades barrera. Todas estas propiedades son compartidas con la mayoría de P3HAs y, del mismo modo, se ha determinado que los productos de biodegradación enzimática del P3HB3HHx son similares a los del P3HB3HV. Es decir, la biodegradación de este copolímero conduce a

la formación de ácido 3-hidroxibutírico, que como se ha indicado, es un elemento natural de la sangre, lo que hace que su eliminación se produzca siguiendo los cauces fisiológicos normales sin perjuicio para el organismo.¹¹

III-1.2. INTERACCIÓN DEL POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-*co*-3-HIDROXIHEXANOATO) CON LA MATRIZ EXTRACELULAR Y SU CITOCOMPATIBILIDAD

El P3HB3HHx es biocompatible con una gran cantidad de líneas celulares, entre las que caben destacar los fibroblastos,¹² células del músculo liso,¹³ condrocitos,^{14,15} osteoblastos y células de la médula espinal,¹⁶ convirtiéndolo en un material muy prometedor para ser empleado en regeneración y sustitución tisular.

De igual modo que para el P3HB3HV y otros poliésteres, las propiedades hidrofóbicas de la superficie del P3HB3HHx suponen una desventaja para la adhesión y proliferación celular, así como para la interacción con la matriz extracelular. Como consecuencia, se hace necesaria una modificación superficial del sustrato polimérico para mejorar la interacción células-sustratos.

III-1.3. ESTRATEGIAS PARA EL USO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-*co*-3-HIDROXIHEXANOATO) EN LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO UROTELIAL

En el apartado II-1.1. del capítulo II, se describieron los principales problemas asociados al aparato urinario, así como los derivados de la actual metodología empleada en su reparación y/o regeneración.

En general, el interés en la correcta reparación del aparato urinario y el tejido urotelial está motivado por hechos como la alta incidencia de graves enfermedades en un amplio número de pacientes. Por ejemplo, el cáncer de próstata representa el segundo tipo de cáncer por incidencia en varones adultos, sólo superado por el de pulmón. Además, el aumento de la edad media de la población, junto con el incremento de la esperanza de vida, especialmente en los países desarrollados, ha producido el constante aumento de las patologías asociadas al aparato urinario.

Siguiendo los planteamientos teóricos apuntados en el capítulo II para el P3HB3HV, y debido a la flexibilidad de este tipo de tejido (vejiga), la disponibilidad de

un método fiable para modificar la superficie de las películas de P3HB3HHx sin producir un deterioro excesivo de sus propiedades mecánicas es una cuestión crítica. La modificación superficial de películas de P3HB3HHx con NaOH vía húmeda se ha explorado con anterioridad, pero no tenemos conocimiento de que se hayan estudiado tratamientos con aminólisis. Por todo ello, en este capítulo se describen los trabajos realizados para la modificación de sustratos de P3HB3HHx empleando métodos húmedos de tratamiento basados en hidrólisis alcalina con NaOH y aminólisis con ED. El objetivo de estas investigaciones es determinar las condiciones que permiten llegar a un compromiso entre la necesaria modificación química superficial de dichos sustratos y el mantenimiento de sus propiedades mecánicas. Estos nuevos grupos funcionales introducidos mediante tratamiento químico en la superficie de las películas serán usados posteriormente para unir covalentemente el fragmento peptídico YIGSR, empleando la metodología desarrollada con anterioridad para sustratos de P3HB3HV.⁷ Se anticipa que este fragmento facilite la adhesión, crecimiento y migración de las células uroteliales, tal y como se ha demostrado que actúa a través de la interacción específica con la membrana basal urotelial.¹⁷

En sustratos bidimensionales se estudió la modificación con ED mediante variaciones en el medio de reacción, agua (H₂O-ED) o isopropanol (IsoOH-ED), la concentración en ED y los tiempos de tratamiento. En las modificaciones con NaOH, las variables objeto de estudio fueron el tiempo de tratamiento y la concentración de hidróxido sódico, empleándose siempre las disoluciones acuosas. A continuación, se estudiaron las propiedades superficiales y estructurales de los sustratos poliméricos tratados, evaluando la influencia de las variables bajo estudio en las películas a emplear en la ingeniería tisular de vejiga.

En base a los resultados de la caracterización y la necesidad de hallar un compromiso entre la funcionalización superficial y las propiedades mecánicas, se eligieron películas modificadas con ED en disolución acuosa para unir, de forma covalente, en su superficie el fragmento peptídico YIGSR. Estos mismos sustratos se emplearon para estudiarse en cultivos de células uroteliales porcinas.

III-1.4. USO DE SUSTRATOS TRIDIMENSIONALES EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDO

Una característica importante para los andamios empleados en ingeniería tisular, en función de la aplicación para la que puedan ser empleados, es la de proporcionar un ambiente tridimensional adecuado que definirá la forma del tejido y permitirá a las células adherirse. Para un andamio tridimensional hay una serie de características que debe cumplir.¹⁸ En primer lugar, debe ser altamente poroso para permitir tanto la penetración celular como el transporte de masa. La penetración celular es básica para el crecimiento celular interno, mientras que los nutrientes y el oxígeno deben difundirse de modo efectivo en el corazón del andamio, permitiendo al mismo tiempo que los desechos metabólicos y los productos de degradación sean retirados de modo efectivo.

En segundo lugar, el andamio debe poseer las propiedades mecánicas adecuadas para la aplicación para la que ha sido desarrollado. Tal y como ha sido demostrado, tanto la morfología como las propiedades mecánicas, influyen en la adhesión y proliferación celular. Simon C. Baker et al.¹⁹ han demostrado que para andamios tridimensionales de PCL y PLGA, las células uroteliales porcinas se adhieren y crecen mejor en los andamios de PCL, como consecuencia de que sus propiedades mecánicas son más similar a las del tejido de la vejiga nativa.

En tercer lugar, y de igual modo que para todos los materiales empleados en ingeniería de tejidos, los andamios 3D deben ser biodegradables y biocompatibles para evitar una respuesta inmune y permitir la regeneración total del tejido nativo. Junto con determinadas macromoléculas de origen natural, los polímeros se ajustan a estas tres características de un modo bastante adecuado. Los ejemplos más usuales incluyen PLLA, PGA, PLGA, PCL y P3HB.^{1,18,20}

La morfología de los andamios y las propiedades dependen mucho del método de fabricación.²¹ Variando los parámetros de producción, los andamios se pueden obtener con distintas porosidades y resistencia mecánica.^{22,23} Se han empleado una gran variedad de métodos para obtener estructuras tridimensionales altamente porosas a partir de polímeros biodegradables, como espumación gaseosa,^{24,25} electrospinning,^{18,26} separación de fases,^{18,27,28} impresión en tres dimensiones,²⁹ lixiviación de partículas a partir del método de colada,^{23,28,30,31} liofilización^{32,33} y emulsión-liofilización.^{34,35} Wang

y colaboradores³⁵ emplearon el método de emulsión-liofilización para fabricar andamios con porosidades superiores al 90 % de PLGA, y abrieron el camino a la incorporación de moléculas bioactivas en la estructura del andamio.³⁴

Estos precedentes y la ventaja del uso de sustratos tridimensionales para la regeneración tisular, motivaron el desarrollo de sustratos tridimensionales de P3HB3HHx para la regeneración de tejido urotelial. Por ello, en el presente capítulo se aborda el desarrollo y caracterización de andamios porosos de P3HB3HHx con dos composiciones de 3HHx, 10.4 % y 14.0 % molar. Se estudió la influencia de la composición monomérica en el proceso de obtención y características de los sustratos, mediante microscopía electrónica de barrido, porosimetría de mercurio, picnometría de helio y análisis termo mecanodinámico.

Los andamios tridimensionales se modificaron con tratamiento químico en fase heterogénea con disolución de etilendiamina en isopropanol y se cuantificó la modificación mediante ensayo de ninhidrina. Dada la importancia de las propiedades superficiales, mecánicas y de porosidad de los sustratos en la regeneración celular, tras la modificación química los andamios se volvieron a evaluar mediante SEM, porosimetría de Hg, picnometría de He y DMTA.

Las funcionalidades introducidas con el tratamiento con ED se emplearon para la unión covalente de dos fragmentos peptídicos de laminina. El fragmento peptídico YIGSR, anteriormente empleado en películas de P3HB3HV (capítulos II), se ancló a la superficie de andamios con las dos composiciones en mol de 3HHx (10.4 % y 14 %). Las características físico-químicas y de citocompatibilidad con células uroteliales cancerígenas RT 112 se evaluaron para estos dos andamios. La influencia de la estructura química del fragmento peptídico en las características de los andamios y en el proceso de adhesión celular se evaluó en el presente capítulo mediante la unión covalente del fragmento de la cadena de cis laminina A al sustrato con el 10.4 % en mol de 3HHx, y su comparación con la respuesta obtenida cuando se ancló el fragmento YIGSR.

III-2. MATERIALES Y MÉTODOS

III-2.1. MATERIALES

Poly(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) (P3HB3HHx)

Los copolímeros de origen natural de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato), con 10.4 % ($M_w = 132000 \text{ g mol}^{-1}$) y 14 % ($M_w = 102000 \text{ g mol}^{-1}$) molar de 3-hidroxihexanoato, fueron proporcionados por el Profesor Chen GQ, Universidad de Tsinghua, China.

Reactivos

La etilendiamina (ED) y el hidróxido sódico empleados para la modificación superficial de los sustratos fueron suministrados por Fluka (Steinheim, Alemania) y por Panreac (Barcelona, España), respectivamente. Todos los reactivos se emplearon sin purificación previa.

La ninhidrina para evaluar los grupos amino, el clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, la sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida, el fragmento peptídico de laminina YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) y la cadena de cis laminina A (Cys-Ser-Arg-Ala-Arg-Lys-Gln-Ala-Ala-Ser-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Ser-Ala-Asp-Arg) ($\geq 90 \%$) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

El Span 80 empleado como surfactante para la obtención de los andamios tridimensionales por el método de emulsión-liofilización, fue adquirido a Sigma-Aldrich (Gillingham, Reino Unido)

En el caso de los sustratos bidimensionales, los reactivos para los medios de cultivo celular, así como la dispasa, fueron suministrados por Gibco.

En el caso de los sustratos tridimensionales, los reactivos y soluciones empleadas para la preparación de los medios de cultivo y crecimiento celular son los siguientes: DMEM (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) al que se le añadió un 5 % (v/v) de suero fetal bovino y un 1 % (v/v) de L-glutamina, y RPMI 1640, y fueron todos adquiridos a Sigma-Aldrich (Gillingham, Reino Unido).

El Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol empleado en la determinación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT, se adquirió a Merck Millipore.

El marcaje celular para la observación mediante microscopía de epifluorescencia se hizo con Hoescht 33258, suministrado por Sigma-Aldrich (Gillingham, Reino Unido).

Disolventes y Medios de Reacción

El CHCl_3 empleado en la disolución del polímero para la obtención de las películas y los ensayos de ninhidrina fue suministrado por Carlo Erba Réactifs-SdS (Val de Reuil, Francia).

El agua desionizada empleada en todas las reacciones y disoluciones fue Milli. Q obtenida de un equipo de purificación millipore Milli-U 10.

El ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES) empleado para la disolución tampónada a pH 6.0 para la unión covalente del fragmento pentapeptídico fue suministrado por Sigma-Aldrich.

La disolución tampón de fosfato (PBS), empleada para lavar los sustratos después del injerto de YIGSR, se preparó con fosfato sódico dihidrogenado anhidro (Fluka $\geq 99\%$), hidrogeno fosfato disódico (Panreac, Barcelona, España, $\geq 98\%$) y cloruro sódico (Panreac $\geq 99\%$) para mantener la fuerza iónica (μ) de la disolución constante y controlada.

El isopropanol utilizado en la modificación superficial con ED y en los ensayos de cuantificación con ninhidrina fue suministrado por Panreac (Barcelona, España).

El etanol, empleado para la disolución de la ninhidrina y la esterilización de los sustratos poliméricos antes de los ensayos celulares, se adquirió a VWR ProLAB (Fountain-Sous-Bois, Francia).

El diclorometano ($\geq 99.9\%$), isopropanol ($\geq 99\%$) y éter de petróleo fueron adquiridos a Fisher (Loughborough, Reino Unido).

Los disolventes metanol ($\geq 99.8\%$), dimetil sulfóxido ($\geq 99\%$) y cloroformo ($\geq 99\%$) se adquirieron a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

La acetona ($\geq 99.9\%$), empleada para la fijación celular, fue adquirida a Fluka.

Salvo indicación expresa, todos los reactivos y disolventes se emplearon sin purificación previa.

III-2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Obtención de Películas de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)

Las películas de P3HB3HHx se obtuvieron por el método de colada, según se describe en “*Obtención de Películas de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)*” (Capítulo II). Este método de preparación constituye un método sencillo y reproducible para la obtención de las películas de P3HB3HHx.

Preparación de Andamios Tridimensionales de P3HB3HHx

Los andamios tridimensionales de P3HB3HHx se prepararon mediante el método de emulsión-liofilización. Tras un estudio previo de optimización de las condiciones de obtención de andamios estables, se fijaron algunas de las variables de obtención, variando la cantidad de agua añadida, lo que permite estudiar el efecto del polímero y la cantidad de agua en las características finales de las estructuras tridimensionales obtenidas. De este modo, en un procedimiento estándar de obtención, 2 g de polímero se disolvieron en 10 mL de diclorometano, manteniendo en todos los casos un ratio del 20 % en p/v. Se añadió un 7.8 % (p/p) con respecto al peso total de polímero y agua de Span 80 como surfactante, y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 3 minutos, mediante el empleo de un agitador vertical (50 r.p.m.). Tras la disolución completa y mezcla de los reactivos, se goteó a la disolución agua desionizada, y se agitó verticalmente (1200 r.p.m.) la dispersión durante 12 minutos a temperatura ambiente. Las cantidades de agua añadidas fueron del 25 o 45 % en peso respecto al peso del polímero + el peso del diclorometano.

Durante el proceso de emulsificación, un molde de teflón se enfrió previamente durante 3 min mediante inmersión en N₂ líquido. Se añadió la disolución a los orificios circulares (5 mm de profundidad, 30 mm de diámetro) del molde con ayuda de una

jeringuilla. Se dejó congelar la disolución 3 minutos en el molde y se introdujo en el liofilizador. Las muestras se liofilizaron durante 24 h, a 0.100 mbar de presión con una temperatura del conducto frío de $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras la liofilización de las muestras se quitó la capa superficial de polímero formada en la parte externa de los andamios, ya que durante el proceso de preparación se forma una piel no porosa en la superficie de los discos. A fin de eliminar todo el surfactante remanente (Span 80), los andamios se lavaron en éter de petróleo durante 24 h, bajo agitación. Posteriormente las muestras se secaron a vacío durante 3 h para evaporar todo el éter de petróleo remanente y se almacenaron a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. La Figura III-1 muestra un esquema general del proceso de obtención de los andamios tridimensionales de P3HB3HHx:

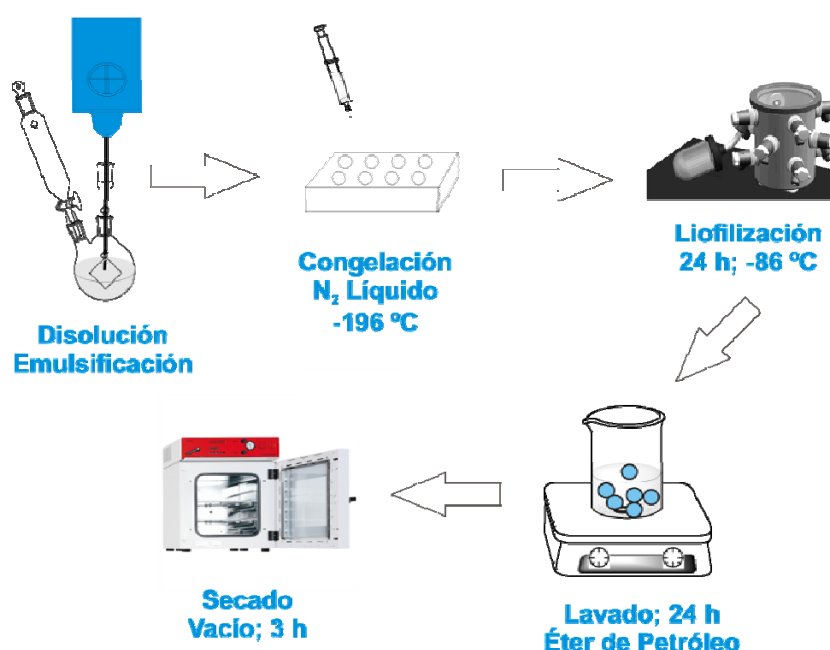


Figura III-1: Esquema general del proceso de obtención de los andamios tridimensionales de P3HB3HHx.

Para la preparación de los andamios se emplearon dos tipos diferentes de copolímeros, con distintas cantidades molares de 3-hidroxihexanoato. También se variaron las condiciones de obtención mediante la modificación de las cantidades de agua añadidas. Todas estas características del proceso de obtención, así como la nomenclatura empleada para las muestras a lo largo de este capítulo se detallan en la Tabla III-1.

Tabla III-1: Condiciones de obtención y nomenclatura de los andamios tridimensionales obtenidos mediante el método de emulsión-liofilización.

Muestra	Polímero	CH ₂ Cl ₂ (mL)	% (p/v) ^a polímero (g)	% (p/p) ^b agua (g)	% (p/p) ^c Span [®] 80 (g)
PHB10.4%HH-a	P3HB3HHx	10	20 (2.0000)	25 (3.8125)	7.8 (0.4534)
PHB10.4%HH-b	(10.4 % HHx)			45 (6.8625)	7.8 (0.6913)
PHB14%HH-a	P3HB3HHx	10	20 (2.0000)	25 (3.8125)	7.8 (0.4534)
PHB14%HH-b	(14 % HHx)			45 (6.8625)	7.8 (0.6913)

^a relación polímero/disolvente

^b relación peso agua/(peso polímero + peso diclorometano)

^c relación peso Span[®] 80/(peso polímero + peso agua)

En el caso de la síntesis de andamios empleados en los estudios celulares, todo el material se esterilizó previamente mediante el empleo de disolución acuosa de etanol al 70 % en volumen, para trabajar en condiciones de semi-esterilidad.

Modificación Superficial de Sustratos Bidimensionales con Hidróxido Sódico

Tal y como se ha demostrado para el caso de otros sustratos poliméricos, el tratamiento mediante hidrólisis alcalina de poliésteres alifáticos proporciona al mismo tiempo la reducción del ángulo de contacto y la introducción de funcionalidades a lo largo de la cadena principal del polímero. Las nuevas funcionalidades pueden ser usadas como puntos reactivos para la posterior funcionalización del sustrato.

El procedimiento experimental es el mismo que el descrito en el Capítulo II, “*Modificación Superficial con Hidróxido Sódico*”.

Se realizó un estudio de la influencia del tiempo de tratamiento y de la concentración de las disoluciones de NaOH en la modificación y, para ello, las películas se modificaron con disoluciones acuosas de NaOH 0.25, 0.5 y 1 M, durante tiempos entre 5 y 60 min. Las nuevas funcionalidades formadas en el P3HB3HHx tras el tratamiento químico con NaOH se muestran en la Figura III-2.

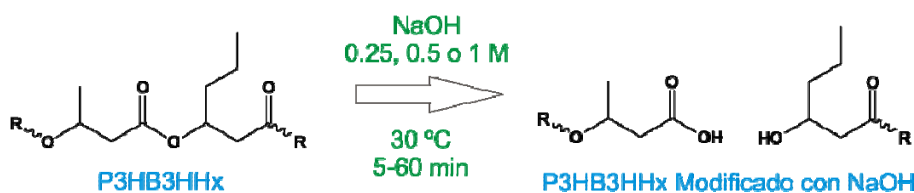


Figura III-2: Esquema general de la reacción química con NaOH de las cadenas poliméricas de P3HB3HHx.

Modificación Superficial de Sustratos Bidimensionales y Andamios Tridimensionales con Etilendiamina

La modificación de los sustratos de P3HB3HHx con ED proporcionará una reducción de la hidrofobicidad de los sustratos, mejorando la interacción con las células y la matriz extracelular, aportando además el injerto a lo largo de la cadena polimérica de grupos funcionales reactivos. Estos grupos funcionales serán empleados también para anclar covalentemente el fragmento de laminina YIGSR.

El procedimiento empleado es el mismo que el descrito en el Capítulo II, “*Modificación Superficial con Etilendiamina*”.

Para estudiar la influencia del medio de reacción en la funcionalización con etilendiamina, se emplearon disoluciones acuosas y alcohólicas (isopropanol) de ED. Así, se utilizaron dos disoluciones de ED en agua al 20 % y al 40 % en volumen durante intervalos de tiempo comprendidos entre 20-360 min, a 50 °C. En el caso de las disoluciones en isopropanol, se emplearon concentraciones de ED al 5 % y 20 % en volumen, modificando los sustratos a distintos tiempos entre 20-200 min, manteniendo la temperatura a 30 °C.

La Figura III-3 ilustra la reacción química producida al tratar las películas de P3HB3HHx con las distintas soluciones de ED, dando lugar a la formación de nuevos grupos funcionales:

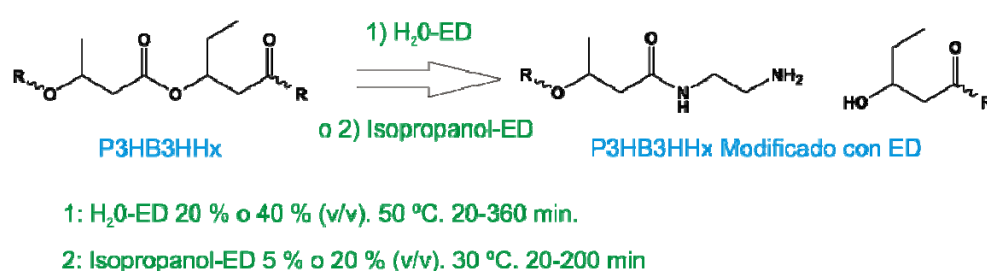


Figura III-3: Esquema general de la reacción química con ED de las cadenas poliméricas de P3HB3HHx.

Para los andamios tridimensionales, las modificaciones se realizaron en disoluciones alcohólicas de Etilendiamina en Isopropanol en concentración del 5 % en volumen, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Como tiempos de tratamiento se emplearon 30 y 90 s. Estudios previos determinaron que la

funcionalización obtenida era suficiente para el anclaje de los fragmentos peptídicos, manteniendo la integridad física de los andamios. En la Tabla III-6 se detallan las condiciones exactas del procedimiento de modificación efectuado, así como la nomenclatura empleada para las muestras a lo largo del presente capítulo.

Unión Covalente de Fragmentos Peptídicos de Laminina

La posibilidad de usar las nuevas funcionalidades introducidas en la superficie del sustrato polimérico se aprovechó para anclar covalentemente el fragmento YIGSR. Se empleó la química de la carbodiimida para activar los grupos ácidos del fragmento peptídico y hacerlos reaccionar con los grupos amino de la superficie polimérica, dando lugar a la formación de nuevos grupos amida.

La metodología empleada es la desarrollada para las películas de P3HB3HV.⁷ Este procedimiento se describe con detalle en el Capítulo II, “*Unión Covalente de Fragmentos Peptídicos de Laminina*” (Figura II-5 A)).

A partir de consideraciones mecánicas y de funcionalización superficial, se escogieron los tratamientos químicos con disolución acuosa de ED al 20 % en volumen durante 40 y 120 min, para llevar a cabo la unión covalente del fragmento peptídico.

El procedimiento general para sustratos tridimensionales es similar al empleado en el Capítulo II, “*Unión Covalente de Fragmentos Peptídicos de Laminina*”, adaptando la metodología a la forma del sustrato (3D) empleada en el presente capítulo. Para la activación y estabilización de los fragmentos peptídicos de laminina, el correspondiente fragmento peptídico (8.41 μ M), la EDC y la NHS se disolvieron en una disolución 0.1 M de tampón MES (pH 6.0), manteniendo la relación molar péptido:NHS:EDC igual a 100/1/4. La activación de los fragmentos peptídicos se realizó durante 6 h a temperatura ambiente, tras lo cual se introdujeron los andamios en la disolución. La reacción se llevó a cabo durante 24 h (25 °C), bajo agitación magnética suave. Tras el tiempo de reacción, los andamios se sacaron de la disolución y se aclararon con abundante agua desionizada para, a continuación, lavarlos durante una hora en solución tampón de PBS (pH 7.4). El proceso de lavado se finalizó con el aclarado de los andamios con abundante agua desionizada y su secado a vacío durante 3 h. Hasta su utilización los andamios se almacenaron a -18 °C. Dado que los posteriores estudios celulares se centraron en el empleo de las muestras idóneas para ello, con las

condiciones de modificación superficial e integridad estructural adecuadas al trabajo posterior, la Tabla III-6 muestra los andamios empleados, así como el fragmento peptídico anclado en sus superficies y la nomenclatura empleada en el presente capítulo.

Medidas de Ángulo de Contacto (Sustratos Bidimensionales) (CA, del inglés Contact Angle)

El proceso de funcionalización introduce nuevos grupos hidrofílicos en las superficies de los sustratos: ácidos carboxílicos, alcoholes, aminas y amidas. Estos grupos reducen la hidrofobicidad de las películas y facilitan su interacción en el medio fisiológico de aplicación. Un método rápido y eficiente de evaluación de la humectabilidad de las superficies es mediante la medida del ángulo de contacto. Considerando que la forma de los sustratos es fundamental en la elección del método de medida del ángulo de contacto, se escogió el método de la gota estática por representar el método más fácilmente adaptable a superficies planas.

Por tanto, para determinar la influencia que los distintos tratamientos tienen sobre la humectabilidad de las películas de P3HB3HHx se midió su ángulo de contacto. También se determinó la variación en la hidrofiliidad después de la reacción con YIGSR. En ambos casos, las medidas se realizaron según la metodología descrita anteriormente en el Capítulo II, “*Medidas de Ángulo de Contacto (CA, del inglés Contact Angle)*” para las películas de P3HB3HV.

Ensayo de Ninhidrina

Los grupos amino introducidos mediante el tratamiento químico en fase heterogénea, así como la funcionalización con el fragmento de laminina fueron cuantificados mediante el ensayo con ninhidrina. La determinación de los grupos amino por unidad de superficie se realizó midiendo el máximo de absorbancia a 560 nm del pigmento púrpura³⁶ formado tras la reacción de los grupos NH_2 con la ninhidrina, según se describe en la metodología experimental del Capítulo II, “*Ensayo de Ninhidrina*”.

Dado que las características superficiales de los andamios hicieron imposible la medida de su superficie específica, a diferencia que para el caso de las películas, en este caso los resultados se presentan por unidad de peso como $\mu\text{mNH}_2 \text{ g}^{-1}$.

Microscopía Infrarroja por Transformada de Fourier Mediante Reflectancia Total Atenuada (Sustratos Bidimensionales) (FTIR-ATR, del inglés Fourier Transform Infrared Spectroscopy-Attenuated Total Reflectance)

La presencia de los grupos amino en la superficie de los sustratos tratados con ED también se determinó empleando la microscopía FTIR-ATR. Los espectros fueron registrados en un espectrómetro Spectrum 2000 FTIR (Perkin-Elmer, Beaconsfield, Reino Unido), empleando un cristal de germanio de 25 mm de diámetro de reflexión simple (índice de reflexión $n = 4.0$). Los espectros se midieron con un ángulo de incidencia de 45° , a 4 cm^{-1} de resolución espectral, entre 4000 y 600 cm^{-1} y acumulando 30 barridos. Todos los espectros se corrigieron a espectros de absorbancia usando una ley simple de dependencia de la longitud de onda asumiendo un contacto óptimo entre la superficie y el cristal. Para asegurarse de la homogeneidad del tratamiento en toda la superficie, se midieron espectros en diferentes regiones de las películas.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, del inglés Scanning Electron Microscopy)

El tratamiento químico de las películas de P3HB3HHx persigue su modificación superficial, pudiendo afectar a la morfología de las mismas. Teniendo en cuenta que la morfología superficial juega un papel importante en la interacción sustrato-célula, las superficies de las películas de P3HB3HHx químicamente tratadas fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido.

Al igual que para las películas de P3HB3HV, (Capítulo II) las muestras se recubrieron con una capa Au-Pd (80/20) de 10 nm de espesor y se observaron en un microscopio electrónico de barrido ambiental de alta resolución PHILIPS XL 30 trabajando a 25 kV.

La morfología superficial de todos los andamios tridimensionales también se estudió con un microscopio electrónico de barrido ambiental FEI XL30. Todas las muestras se fracturaron tras congelación durante 10 minutos en N_2 líquido y se recubrieron con una capa de oro. Se trabajó a una distancia de trabajo de 8-11 mm y un voltaje de 25 kV, observándose la sección transversal de las muestras a distintos aumentos. La observación de los andamios mediante SEM permitió determinar la distribución de los poros, así como la degradación superficial producida por los distintos tratamientos realizados a las muestras.

Ensayos de Esfuerzo-Deformación (Sustratos Bidimensionales)

Considerando que las aplicaciones *in vivo* de los sustratos requieren propiedades mecánicas adecuadas para mantener la función fisiológica de la vejiga, se determinaron sus propiedades mecánicas mediante ensayos de esfuerzo-deformación.

Los ensayos esfuerzo-deformación son ensayos estáticos, en los que se analiza la deformación producida en una muestra a velocidad de estirado constante. A partir de estos ensayos se pueden determinar parámetros mecánicos del polímero que permiten realizar un estudio sobre el comportamiento mecánico de las muestras analizadas. Las probetas se obtuvieron con un troquel a partir de las películas preparadas por el método de colada. La forma y dimensiones de las probetas se muestran en la Figura III-4:

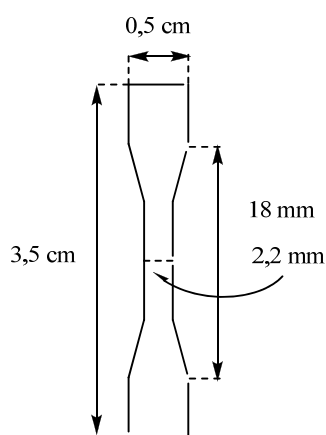


Figura III-4: Dimensiones de las probetas en forma de halterio, para ensayos mecánicos.

Los ensayos mecánicos se realizaron en un equipo Instron, modelo 3366, a temperatura ambiente y una velocidad de deformación de 5 mm min^{-1} . Se utilizó una célula de carga de 100 N y una precarga de 0.3 N. Los resultados se representaron en gráficas σ - ε y se tomaron como valores característicos la elongación máxima a rotura, ε_R , el esfuerzo máximo de tracción a rotura, σ_R , y el módulo elástico o de Young, E . Las medidas se realizaron por triplicado para cada tipo de película y los resultados se representan como la media de las tres medidas \pm la desviación estándar.

Mediante ensayos de esfuerzo-deformación se midieron las propiedades mecánicas de las muestras tratadas con ED en disolución acuosa en el intervalo 20-80 minutos y para ambas concentraciones, 20 % y 40 % en volumen. De igual modo se ensayaron las muestras tratadas en disolución alcohólica al 5 % para los tiempos de

tratamiento 20-200 minutos y 20-60 minutos cuando los sustratos se trataron con la disolución más concentrada de ED en isopropanol (20 % en volumen).

Picnometría de Helio (Andamios Tridimensionales)

El volumen y la densidad de polvos y sólidos porosos con forma irregular se pueden determinar mediante picnometría de gases. Para polvos finos o materiales porosos es necesario utilizar He como gas inerte si se desea obtener una medida precisa. La picnometría de gases se basa en la ley de Boyle, que relaciona volumen y presión y describe la relación inversamente proporcional entre la presión absoluta de un gas y el volumen que ocupa a temperatura constante en un sistema cerrado. A partir de la suposición del comportamiento ideal de los gases, y del mantenimiento constante de la temperatura durante el proceso de modificación de la presión o el volumen, la ley de Boyle se puede escribir como:

$$P_1V_1 = P_2V_2 \quad [1]$$

donde P es igual a presión, V volumen, y 1 y 2 el estado inicial y final respectivamente.

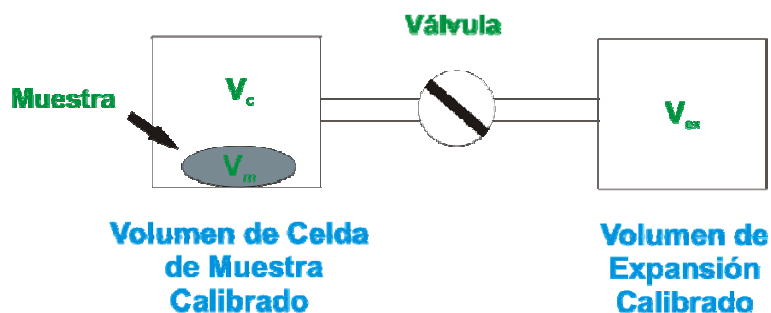


Figura III-5: Esquema simplificado del picnómetro de helio AccuPyc II. Donde V_m es el volumen de la muestra, V_c el volumen de la celda de la muestra y V_{ex} el volumen de la celda de expansión.

Las medidas se realizaron empleando un picnómetro AccuPyc II de micromeritics. Este equipo es un picnómetro de desplazamiento de gas que determina el volumen de objetos sólidos con forma regular o irregular, mediante medidas de presión. Un esquema simplificado del picnómetro es el mostrado en la Figura III-5.

Partiendo de la asunción de que a V_c y V_{ex} están a presión y temperatura ambiente, P_a y T_a respectivamente, se cierra la válvula. Con la válvula cerrada V_c se

carga a elevada presión P_l . Con esto, la ecuación de balance de masas a través de la celda de la muestra, V_m , es:

$$P_l (V_c - V_m) = n_c R T_a \quad [2]$$

donde n_c es el número de gases en la celda de la muestra, R , la constante de los gases ideales y T_a la temperatura ambiente. A partir de esta suposición de partida, y mediante el empleo de la ecuación de estado de los gases ideales y la ley de Boyle, se llega a la siguiente ecuación de trabajo para el picnómetro:

$$Vm = Vc - \frac{V_{ex}}{\frac{P_{1g}}{P_{2g}} - 1} \quad [3]$$

con $P_{1g} = P_l - P_a$ y $P_{2g} = P_2 - P_a$, siendo P_l la presión inicial y P_2 la presión parcial de un punto de medición intermedio. Se emplean procedimiento de calibración para determinar V_c y V_{ex} y las presiones se miden a partir de un transductor gauge de presión. Para que la medida sea precisa cada muestra se midió tres veces, presentándose el resultado como la media \pm la desviación estándar. Las muestras se secaron a vacío durante 2 h a fin de evitar al máximo la presencia de disolventes en la superficie polimérica y se atemperaron durante 20 minutos antes de la medición a 25 °C.

Determinación de la Porosidad de los Andamios Tridimensionales

Puesto que la geometría de los andamios está bien definida, es posible determinar la porosidad de los mismos a partir de un método rápido y sencillo. Para ello, a partir de la medida del peso y el volumen de los discos, se puede determinar la densidad aparente del andamio poroso, ρ . A partir de esta medida, y si la densidad del material constituyente del esqueleto es conocida (material polímero en nuestro caso), ρ_0 , la porosidad total se puede determinar a partir de la ecuación:

$$P = (1 - \rho/\rho_0) \times 100 \quad [4]$$

Con ello, la densidad aparente se calculó a partir de la medida de las dimensiones y el pesaje de los andamios. Tres discos de cada muestra fueron pesados en una balanza analítica y sus dimensiones se determinaron con un calibre. La densidad aparente se cálculo para cada disco y se dio su valor para cada muestra como la media

de las tres medidas \pm la desviación estándar. Como valor de ρ_0 se tomó el valor determinado para cada tipo polímero mediante picnometría de helio.

Porosimetría por Intrusión de Mercurio (Andamios Tridimensionales) (MIP, del inglés Mercury Intrusion Porosimetry)

La porosimetría de mercurio se basa en la ley de la capilaridad que controla la penetración de un líquido en un orificio pequeño. Esta ley, en el caso de un líquido no humectante como el mercurio y poros cilíndricos se expresa mediante la ecuación de Washburn (1921):

$$D = -\left(\frac{1}{P}\right) 4\gamma \cos \varphi \quad [5]$$

donde D, es el diámetro de poro, P, la presión aplicada, γ , la tensión superficial, y, φ , el ángulo de contacto. El volumen de mercurio, V, que penetra en los poros es medido directamente como función de la presión aplicada. Esta relación P-V sirve para caracterizar la estructura de los poros.

La tensión superficial del mercurio varía con la pureza, utilizando en nuestras medidas una tensión superficial de 485 dinas cm⁻¹, determinada por la pureza del Hg empleado. Como ángulos de contacto de avance y retroceso se empleó el valor de 130°, utilizándose para el análisis un equipo Micromeritics Autopore IV.

Se usaron penetrómetros de 1,836 mL de volumen. Las muestras se introdujeron en el penetrómetro y se midieron en el rango de bajas y altas presiones, entre 0,10 y 1600,00 psia. La presión de evacuación fue de 50 μ mHg y de llenado de mercurio de 0,20 psia. Estas condiciones de análisis se escogieron en función de ensayos previos y con el objetivo de prevenir las muestras de la rotura o deformación durante el ensayo, teniendo en cuenta la fragilidad de los andamios tridimensionales.

Análisis Termo Mecanodinámico (Andamios Tridimensionales) (DMTA, del inglés Dynamic Mechanical Thermal Analysis)

Las medidas mecanodinámicas se realizaron en un Analizador Rheometric Scientific DMTA V. Se midió el módulo de almacenamiento y de carga de todas las muestras a 37 °C utilizando ensayos de compresión.

Para ello, tres especímenes de cada tipo de muestra fueron analizados presentándose los resultados como la media \pm la desviación estándar. Discos de aproximadamente 1 mm de espesor y 12 mm de diámetro se usaron para todos los experimentos.

Tras montar las muestras entre mordazas circulares de compresión (20 mm de diámetro) se atemperaron a 37 °C durante 20 min antes de su medida. Se aplicó una frecuencia constante de 1 Hz y se incrementó la fuerza hasta la rotura de las muestras, midiendo los módulos.

Ensayos Celulares con Células Uroteliales Porcinas en Sustratos Bidimensionales

La evaluación de la citocompatibilidad de los sustratos poliméricos se realizó con células uroteliales porcinas en el Hospital Universitario Fundación de Alcorcón según el procedimiento descrito para el P3HB3HV en el Capítulo II, “*Procedimientos de obtención y sembrado de las células uroteliales porcinas*”. Se estudiaron los sustratos de P3HB3HHx sin modificar, sustratos modificados con disolución acuosa de ED al 20 % durante 40 y 120 min, y sustratos modificados con ED al 20 % durante 40 y 120 min con el fragmento YIGSR anclado a la superficie.

En el presente Capítulo se estudió la morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido como en el Capítulo II, sección “*Estudio de la interacción PHAs-células uroteliales porcinas y observación morfológica de las células mediante microscopía electrónica de barrido*”. Los estudios morfológicos se realizaron en las muestras tratadas con ED al 20 % en volumen durante 40 y 120 minutos con y sin el fragmento peptídico YIGSR unido covalentemente a su superficie y en muestras de P3HB3HHx sin tratar, empleadas como referencia.

Ensayos Celulares con Células Uroteliales Cancerígenas RT 112 en Andamios Tridimensionales

Para determinar la viabilidad celular de los andamios tridimensionales desarrollados para su empleo en regeneración de tejido urotelial, se llevaron a cabo ensayos con células uroteliales cancerígenas RT 112. Las células fueron suministradas por el grupo de la profesora Jennifer Southgate, de la unidad Jack Birch for Molecular Carcinogenesis del departamento de Biología de la Universidad de York (Reino Unido).

Se escogió esta línea celular por representar un buen punto de partida para la aproximación inicial al problema de la reconstrucción tisular urotelial.

En todos los casos estudiados, y a pesar de que las condiciones de obtención de los andamios fueron en esterilidad, los andamios se volvieron a esterilizar en disolución acuosa de etanol al 70 % en volumen durante 2 h antes de su utilización. A continuación se retiró la disolución de etanol y se lavaron las muestras con disolución tampón de PBS (pH 7.4) durante 10 minutos. Para finalizar el acondicionamiento de los andamios, se lavaron con medio de crecimiento (DMEM:RPMI; 5 % suero fetal bovino; 1 % L-glutamina), durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente en un vial (50 mL) estéril. El proceso se repitió tres veces.

Tras el acondicionamiento, los discos (1.5 mm de espesor; 14 mm Ø) se colocaron en placas de cultivo de 6 pocillos, entre dos anillos de acero inoxidable. Los anillos se esterilizaron previamente mediante autoclave 120 minutos inmersos en disolución tampón de PBS (pH 7.4). Esta configuración del experimento evita el contacto de los discos de polímero con el fondo de las placas, donde se puede producir la adhesión y proliferación de las células, evitando de este modo errores en la cuantificación del crecimiento celular. Los anillos de acero inoxidable también evitan la flotabilidad de los andamios, previniendo el contacto con las paredes y asegurando, en la medida de lo posible, la estabilidad y reproducibilidad de los ensayos realizados.

Se añadieron 50 µL de medio de cultivo con 2.2×10^5 células a cada andamio y se incubaron durante 2 h a 37 °C en un incubador, en atmósfera controlada al 10 % de saturación de CO₂ en aire y 90 % de humedad. El número de células añadido se escogió en función de la línea celular, del tamaño de la muestra a sembrar y del tiempo de experimento programado.

Tras la incubación celular se añadieron 6 mL de medio de crecimiento a cada pocillo, hasta cubrir por completo los discos. El medio de crecimiento se retiró y renovó cada 3 días, comprobando que no se hubiera producido contaminación de las muestras.

Se realizaron dos tipos diferentes de ensayo celulares, para evaluar las diferencias de comportamiento en función del tipo de copolímero empleado en la fabricación de los andamios; y con un tipo de andamio y los dos fragmentos de laminina, para evaluar el efecto del recubrimiento en la interacción células-sustrato. Las

condiciones de los ensayos se detallan a continuación. Se emplearon criterios de estabilidad mecánica y dimensional a lo largo del proceso de modificación y posterior cultivo para la elección de las muestras objeto de estudio.

Evaluación del comportamiento celular dependiente del copolímero empleado

En este ensayo se emplearon los andamios PHB10.4HH-YIGSR y PHB14HH-YIGSR. Se sembraron tres especímenes de cada muestra para cada día de estudio, realizándose el estudio durante una semana. Se evaluaron los resultados mediante epifluorescencia a los 3, 5 y 7 días, analizando las diferencias observadas entre los andamios.

Evaluación de la proliferación celular en función del fragmento peptídico

La distinta longitud de los fragmentos peptídicos empleados debe proporcionar una interacción diferencial con la membrana celular de las células RT 112, dando lugar a una respuesta diferenciada en función del fragmento peptídico empleado. El uso de fragmentos peptídicos de mayor longitud (fragmento de cis lamina A), con estructuras más similares a los naturales, debería proporcionar una mejor respuesta celular, de adhesión y proliferación. En este ensayo se emplearon las muestras PHB10.4HH-YIGSR, PHB10.4HH-Cis y la muestra PHB10.4HH-a como referencia. Se sembraron las células según el procedimiento descrito con anterioridad y se estudiaron por epifluorescencia a los 1 y 4 días. La medida de la proliferación se realizó mediante ensayo de MTT.

Microscopía de Epifluorescencia (Andamios Tridimensionales)

Los andamios estudiados para evaluar el comportamiento diferencial celular dependiente del tipo de copolímero empleado en su preparación, se observaron por microscopia de epifluorescencia. Para ello, se aspiró el medio de crecimiento y se lavaron las muestras con PBS cinco veces. A continuación, se fijaron y permeabilizaron las células por inmersión en una mezcla metanol/acetona (1:1) durante 1 minuto. Tras la permeabilización de la membrana se marcó el ADN nuclear de las células con colorante Hoescht 33258 disuelto en PBS (1mg/10 mL-1:10000).

Las muestras marcadas se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Stereo Lumar V12). Se excitó con luz ultravioleta (350 nm) y se observó la

emisión de fluorescencia azul a 461 nm. Esta observación permitió determinar la presencia y distribución en su caso, de las células sembradas a lo largo del tiempo de estudio del ensayo.

Ensayo de Bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil tetrazolio) (Andamios Tridimensionales) (Ensayo MTT, del inglés (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide))

El ensayo MTT permite determinar el efecto citotóxico sobre líneas celulares tumorales. Está basado en la reducción del reactivo MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color violeta (Figura III-6), lo que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

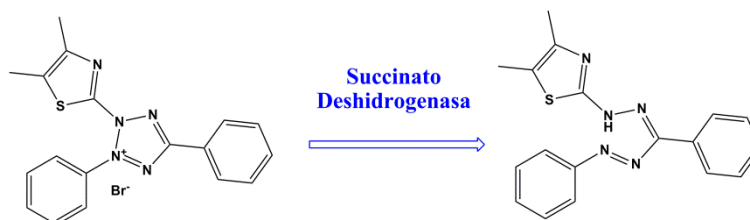


Figura III-6: Reacción de reducción del reactivo MTT por la enzima succinato deshidrogenasa.

La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de coloración obtenida, lo que permite la cuantificación celular mediante el empleo de técnicas de espectroscopia UV-Vis.

El ensayo se empleó para determinar la citotoxicidad y proliferación celular en función del fragmento peptídico anclado y un andamio de referencia. El ensayo se realizó a las muestras PHB10.4%HH-a2, PHB10.4%HH-YIGSR y PHB10.4%HH-Cis.

Para llevar a cabo el ensayo se aspiró el medio de crecimiento de la placa de cultivo y se lavaron los andamios 3 veces con PBS, con objeto de eliminar todas las células no adheridas a las muestras. Se transfirieron las muestras a una nueva placa de 24 pocillos, evitando de este modo el análisis de las células que pudieran haber crecido en el resto de las superficies de la placa de cultivo. Se añadió 1 mL de la disolución de MTT con medio de crecimiento (1:10) a los andamios y se incubaron durante 4 h (10 % CO₂ en aire y 90 % de humedad).

Tras la incubación, se añadieron 800 μL de DMSO a las muestras y se agitaron horizontalmente durante 15 minutos. Para asegurar que el análisis fuera cuantitativo, fue necesario disolver los andamios con 2 mL de acetona. Se pipetearon 200 μL de cada disolución de las muestras a seis pocillos de una placa de 96 pocillos. Se analizaron tres especímenes de cada tipo. Se rellenaron 6 pocillos con DMSO/acetona (1:2,5) a modo de referencia para el disolvente. Puesto que el andamio puede presentar coloración, se empleó una muestra de referencia, incubada según el procedimiento estándar, pero sin el sembrado previo de células uroteliales cancerígenas. Esta muestra se sometió al ensayo de MTT y se rellenaron 6 pocillos con 200 μL de la disolución resultante.

El resultado se dará como el valor de la absorción en los seis pocillos analizados para cada espécimen, promediados con las tres muestras analizadas de cada tipo \pm la desviación estándar.

III-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III-3.A. SUSTRATOS BIDIMENSIONALES PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO UROTELIAL

III-3.A.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

La Tabla III-2 muestra la identificación de las muestras preparadas y analizadas en el presente capítulo, con la descripción del tratamiento químico realizado para cada muestra. El sufijo YIGSR indica las muestras a las que se ha injertado el fragmento peptídico de laminina YIGSR, y que serán empleadas también para llevar a cabo los ensayos celulares con células uroteliales porcinas.

Tabla III-2: Muestras preparadas y estudiadas en el capítulo III con el tratamiento químico realizado a cada una de ellas y la nomenclatura empleada. Muestras modificadas con ED.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (min)
PHH-ref	NO	0
PHHEA-220	Agua-ED 20 % (v/v)	20
PHHEA-240		40
PHHEA-260		60
PHHEA-280		80
PHHEA-2120		120
PHHEA-2200		200
PHHEA-2280		280
PHHEA-2360		360
PHHEA-240-YIGSR		40
PHHEA-2120-YIGSR		120
PHHEA-420	Agua-ED 40 % (v/v)	20
PHHEA-440		40
PHHEA-460		60
PHHEA-480		80
PHHEA-4120		120
PHHEA-4200		200
PHHEA-4280		280
PHHEA-4360		360
PHHEI-0.520	Isopropanol-ED 5 % (v/v)	20
PHHEI-0.540		40
PHHEI-0.560		60
PHHEI-0.580		80
PHHEI-0.5120		120
PHHEI-0.5200		200
PHHEI-220	Isopropanol-ED 20 % (v/v)	20
PHHEI-240		40
PHHEI-260		60
PHHEI-280		80
PHHEI-2120		120
PHHEI-2200		200

Tabla III-2-Continuación: Muestras preparadas y estudiadas en el capítulo III con el tratamiento químico realizado a cada una de ellas y la nomenclatura empleada. Muestras modificadas con NaOH.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (min)
PHHN-0.255	NaOH 0.25 M	5
PHHN-0.2510		10
PHHN-0.2520		20
PHHN-0.2530		30
PHHN-0.2540		40
PHHN-0.2550		50
PHHN-0.2560		60
PHHN-0.55	NaOH 0.5 M	5
PHHN-0.510		10
PHHN-0.520		20
PHHN-0.530		30
PHHN-0.540		40
PHHN-0.550		50
PHHN-0.560		60
PHHN-15	NaOH 1 M	5
PHHN-110		10
PHHN-120		20
PHHN-130		30
PHHN-140		40
PHHN-150		50
PHHN-160		60

III-3.A.2. EVALUACIÓN DE LA MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE LOS SUSTRATOS

El procedimiento de funcionalización seleccionado, mediante tratamiento químico en fase heterogénea, debe conducir a la obtención de una modificación superficial homogénea. El grado de modificación, mediante los tratamientos con NaOH y etilendiamina, se evaluó mediante el empleo de distintas técnicas dirigidas a la obtención de información que permita mejorar el conocimiento de la de modificación.

III-3.A.2.1. MEDIDA DEL ÁNGULO DE CONTACTO

Los métodos de modificación por vía húmeda permiten un control de la modificación no proporcionada por otros métodos, lo que los hace ideales para la modificación superficial de sustratos poliméricos. Dado que el primer objetivo de la modificación química es el aumento de la hidrofiliidad de los sustratos, el resultado de

la misma se evaluó mediante medidas del ángulo de contacto. La Figura III-7 muestra los resultados obtenidos para las muestras tratadas con ED.

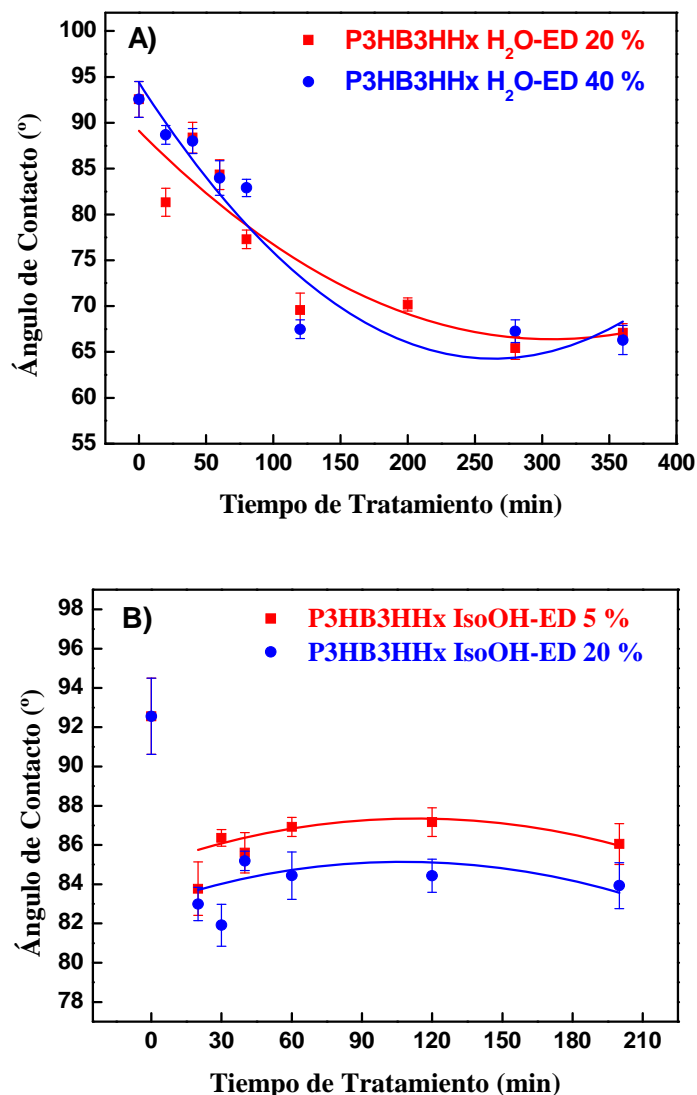


Figura III-7: Valores del ángulo de contacto medidos por el método de la gota estática de las muestras tratadas con ED en disolución acuosa A) o en disolución alcohólica B).

El valor del ángulo de contacto para la película de P3HB3HHx es aproximadamente 93°, ligeramente superior al ángulo de contacto típico determinado para los copolímeros de P3HB3HV (alrededor de 80°)¹³, lo que se atribuye al mayor carácter hidrofóbico de las cadenas de 3HHx con respecto al 3HV. Además de este hecho, se observó un incremento de la hidrofiliicidad, reflejado en una disminución del ángulo de contacto, para las muestras tratadas en disolución acuosa de ED con el incremento del tiempo de tratamiento. Aunque la reducción de ángulo de contacto es destacable, hasta un valor de 68°, cuando las películas se tratan con una disolución

agua-ED, no se determinó relación alguna entre la concentración de ED empleada y la hidrofiliidad de las películas.

Los tratamientos de aminólisis en medio alcohólico mostraron una reducción del ángulo de contacto con respecto a PHH-ref, independientemente del tiempo de tratamiento. En este caso, a diferencia de lo observado para los tratamientos con agua-ED, la concentración en volumen de ED parece influir en la variación de la humectabilidad de los sustratos, consiguiéndose una reducción (en torno a 2°) del ángulo de contacto ligeramente superior con la disolución más concentrada. Estos resultados, independientes del tiempo de tratamiento, contrastan con los obtenidos por Wang y colaboradores³⁷ para los copolímeros de P3HB3HV, donde se observó una reducción significativa de los valores del ángulo de contacto cuando se trataron con 1,6-hexanodiamina en isopropanol.

La hidrofiliidad de las superficies tratadas con NaOH también se evaluó mediante medidas del ángulo de contacto y los resultados obtenidos se muestran en la Figura III-8.

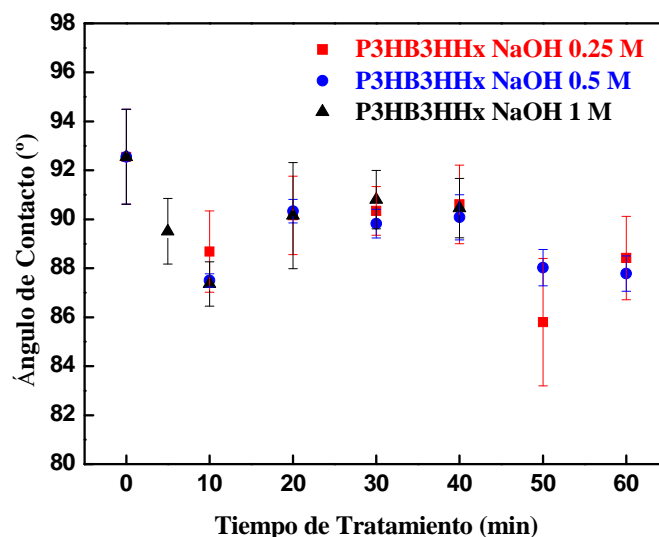


Figura III-8: Valores del ángulo de contacto medidos por el método de la gota estática de las muestras tratadas con NaOH en disolución acuosa.

La eficiencia del tratamiento con NaOH para disminuir la hidrofobicidad es limitada, a la vista de los valores obtenidos de ángulo de contacto. El comportamiento

es independiente de la concentración de la disolución, lo que puede ser atribuido a la influencia de la rugosidad en los valores medidos, de modo independiente a la funcionalización obtenida.

III-3.A.2.2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL MEDIANTE ENSAYO DE NINHIDRINA

El ensayo de cuantificación con ninhidrina se empleó para estimar el número de grupos amino introducidos en la superficie de las películas de P3HB3HHx por ambos tratamientos de aminólisis. La Figura III-9 muestra la densidad de grupos amino en función del tiempo de aminólisis para las muestras tratadas con la disolución acuosa de ED a las dos concentraciones empleadas, 20 y 40 % en vol.

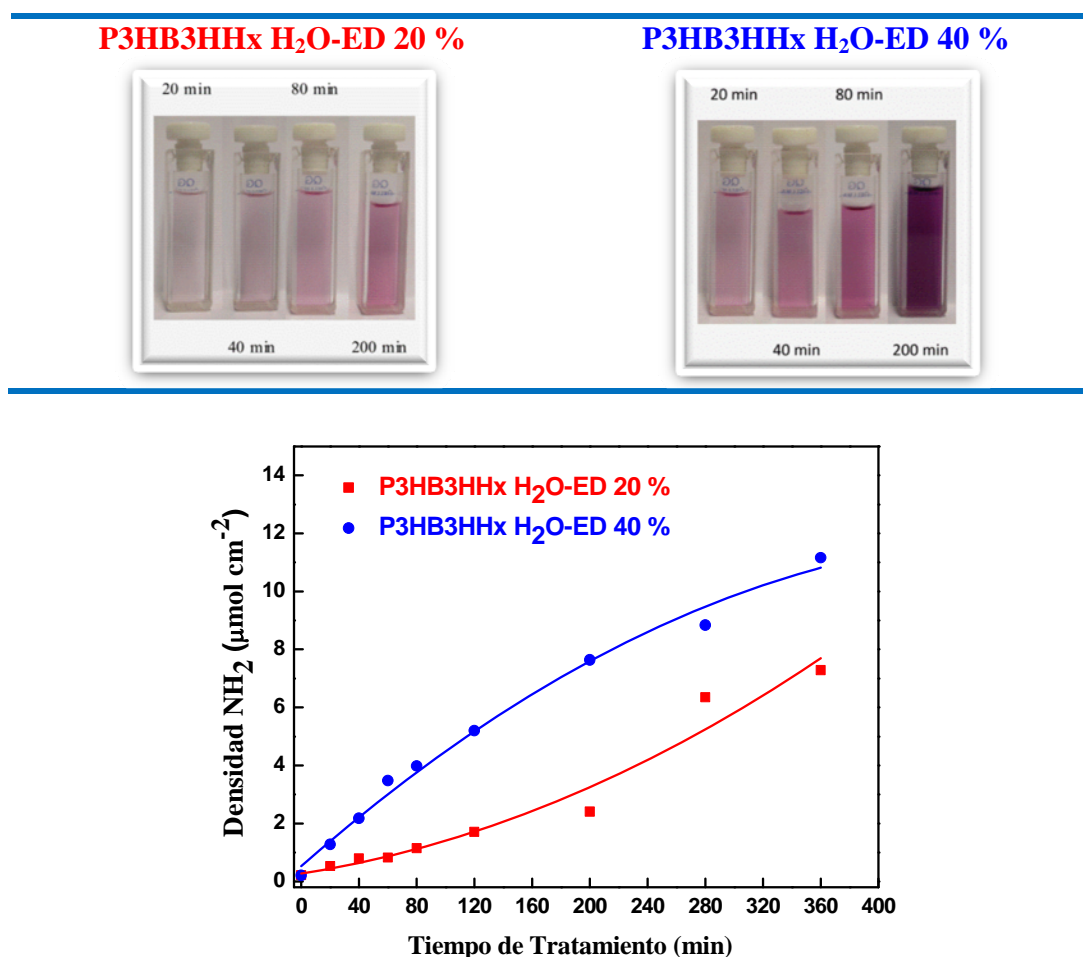


Figura III-9: Densidad superficial de grupos amino determinada mediante el ensayo de ninhidrina para las películas de P3HB3HHx tratadas con disoluciones acuosas de ED al 20 % y 40 % en volumen. Las fotografías muestran el incremento de color producido por la formación

de mayor cantidad de pigmento púrpura de Ruhemann, en función del tiempo de tratamiento, como consecuencia de la mayor cantidad de grupos amino presentes.

El número de grupos -NH_2 aumenta con el tiempo de tratamiento, siendo superior para la disolución más concentrada de ED, con un valor máximo de 11.2 (40 % ED, 360 min) frente al valor de 7.3 para 360 minutos de tratamiento y 20 % en volumen de concentración.

La Figura III-10 muestra la funcionalización superficial de las películas de P3HB3HHx determinada mediante ensayo de ninhidrina para las muestras tratadas con la disolución alcohólica. En este caso, la funcionalización depende del tiempo de tratamiento y de la concentración de ED empleada, tal y como cabría esperar, y del mismo modo que sucede cuando la reacción se lleva a cabo en medio acuoso.

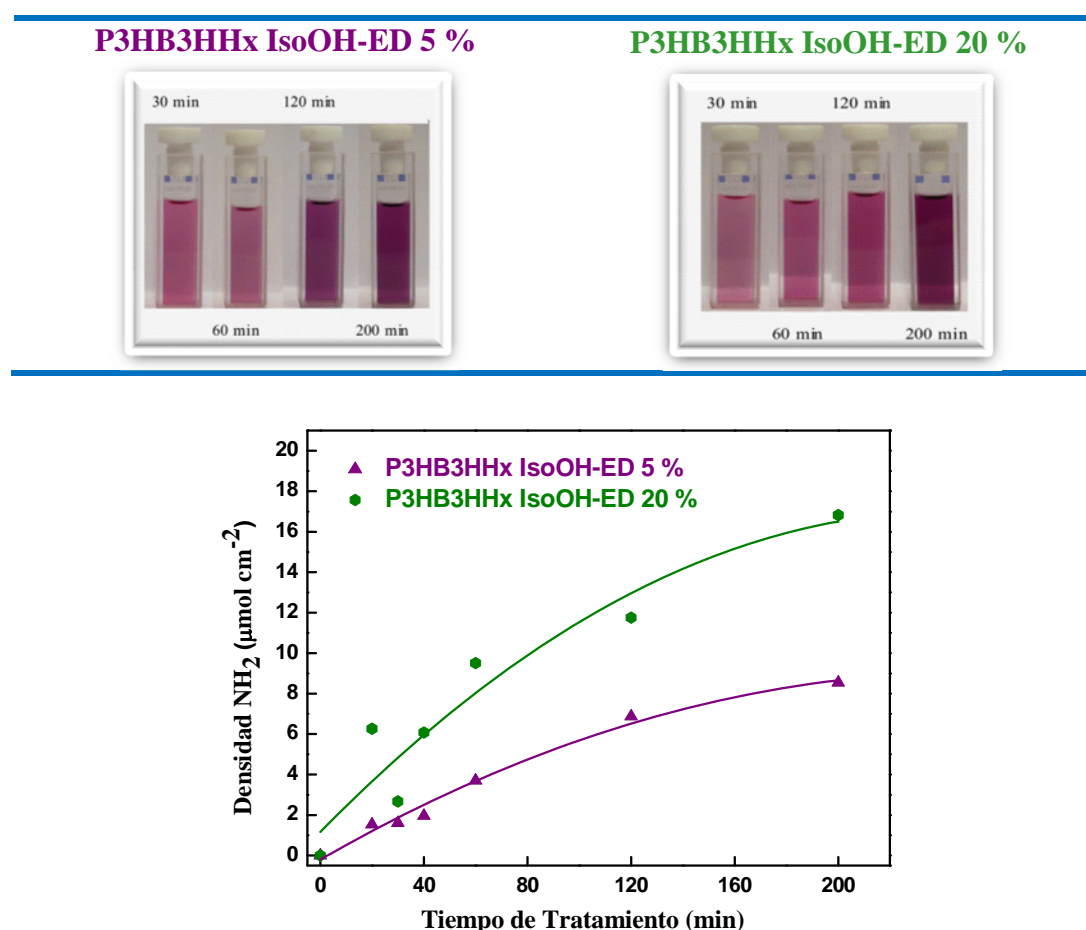


Figura III-10: Densidad superficial de grupos amino determinada mediante el ensayo de ninhidrina para las películas de P3HB3HHx tratadas con disoluciones alcohólicas de ED al 5 % y 20 % en volumen. Las fotografías muestran el incremento de color producido por la formación

de mayor cantidad de pigmento púrpura de Ruhemann, en función del tiempo de tratamiento, como consecuencia de la mayor cantidad de grupos amino presentes.

Los resultados de los ensayos de ninhidrina muestran que el grado de funcionalización con isopropanol es significativamente mayor que cuando se usa la disolución acuosa. Esta funcionalización es aproximadamente ocho veces superior para una concentración similar y el mismo tiempo de tratamiento:

$$\text{H}_2\text{O-ED } 20 \%, 200 \text{ min} = 2.4 (\mu\text{mol NH}_2 \text{ cm}^{-2})$$

$$\text{IsoOH-ED } 20 \%, 200 \text{ min} = 16.8 (\mu\text{mol NH}_2 \text{ cm}^{-2})$$

Esta diferencia de reactividad puede ser atribuida al alto carácter hidrofóbico de las películas de P3HB3HHx ($\theta = 93^\circ$), que dificulta la funcionalización en medio acuoso y facilita la interacción disolución-sustrato en medio isopropanol.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de ninhidrina contrastan con los obtenidos para la humectabilidad de las películas mediante medidas de ángulo de contacto. Mientras que para las películas tratadas con la disolución acuosa se observó un marcado aumento de la humectabilidad con el tiempo de tratamiento; en el caso de las muestras tratadas con la disolución alcohólica, el tratamiento no modificó sustancialmente la humectabilidad de las superficies. Dado que el ensayo de ninhidrina determinó una mayor funcionalización de las superficies tratadas con isopropanol, la ausencia de variación del ángulo de contacto debe ser consecuencia de otros factores. Es conocido que el ángulo de contacto no sólo depende del número de los grupos funcionales introducidos, si no que otros factores, como la rugosidad, pueden afectar a la medida de esta variable mediante el método de la gota estática.^{19,38}

III-3.A.2.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FUORIER MEDIANTE REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA

La funcionalización con aminas determinada a partir del ensayo de ninhidrina, también se evaluó haciendo uso de la microscopia infrarroja por transformada de Fourier mediante reflexión total atenuada (FTIR-ATR). La Figura III-11 muestra los espectros obtenidos para muestras tratadas con ED al 20 % en volumen, a distintos tiempos, normalizados en relación con la intensidad de la banda a 1382 cm^{-1} , atribuida a

las vibraciones simétricas de los grupos CH_3 del poli(3-hidroxibutirato), e independiente de la cristalinidad del sustrato a temperatura constante.

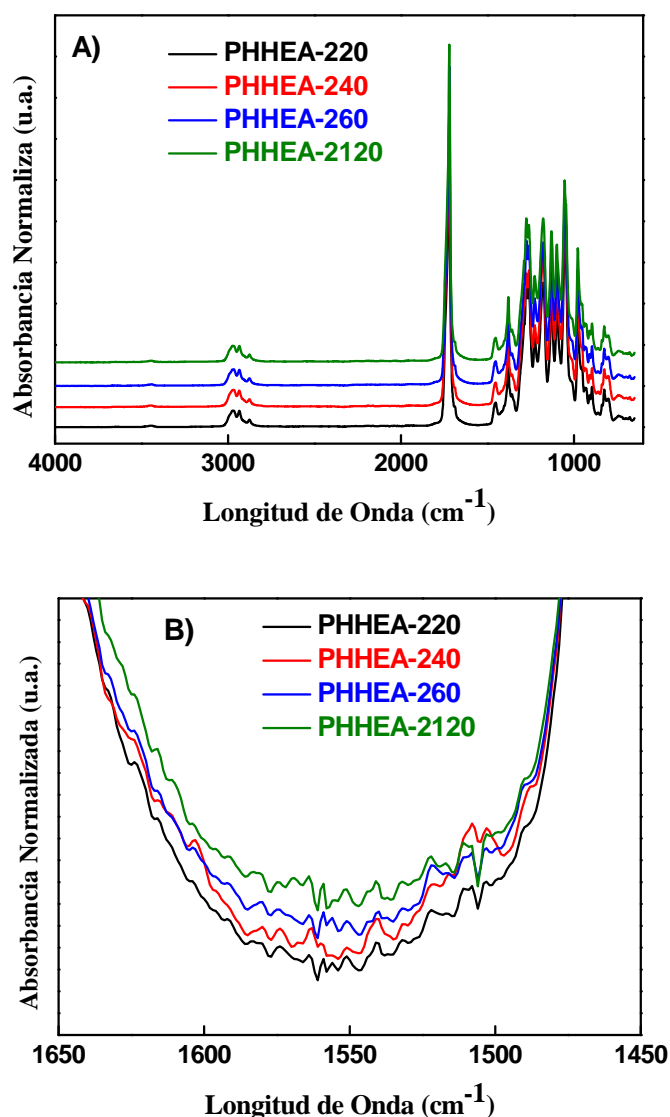


Figura III-11: Espectros normalizados de FTIR-ATR de las muestras PHHEA-220, PHHEA-240, PHHEA-260 y PHHEA-2120 en A) todo el intervalo de medida, $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ (espectros desplazados en el eje y por claridad) y B) ampliación entre $1650\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$.

En la Figura III-11 se puede apreciar que los distintos tratamientos no modifican sustancialmente los espectros de las películas, sin observarse la aparición de nuevas bandas atribuibles al proceso de modificación química realizado. Tampoco se aprecia la banda a 1575 cm^{-1} (Figura III-11 B)) correspondiente a la vibración de tijera de los grupos --NH_2 de nuevas funcionalidades amínicas introducidas mediante la aminólisis y que si se ha detectado por esta técnica para otros poli(hidroxialcanoatos).⁷

A pesar de que algunos autores³⁹ han sugerido la menor sensibilidad de la espectroscopia infrarroja respecto al ensayo de ninhidrina, los elevados valores de grupos amino por unidad de superficie determinados mediante el ensayo de ninhidrina, parecen indicar la viabilidad de la espectroscopia FTIR-ATR para la detección de los grupos amino. Por tanto, la ausencia de la banda a 1575 cm^{-1} puede ser atribuida a las características superficiales de las muestras de PHBHHx, cuya rugosidad y/o agujeros pueden producir la dispersión del haz de IR y/o un contacto inadecuado entre el cristal de Germanio del ATR y la superficie poliméricas.

III-3.A.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La morfología superficial de los sustratos puede influir en la humectabilidad de las superficies y en la adhesión celular. Para evaluar los cambios que el tratamiento químico puede producir en la superficie de las películas, se analizaron mediante SEM.

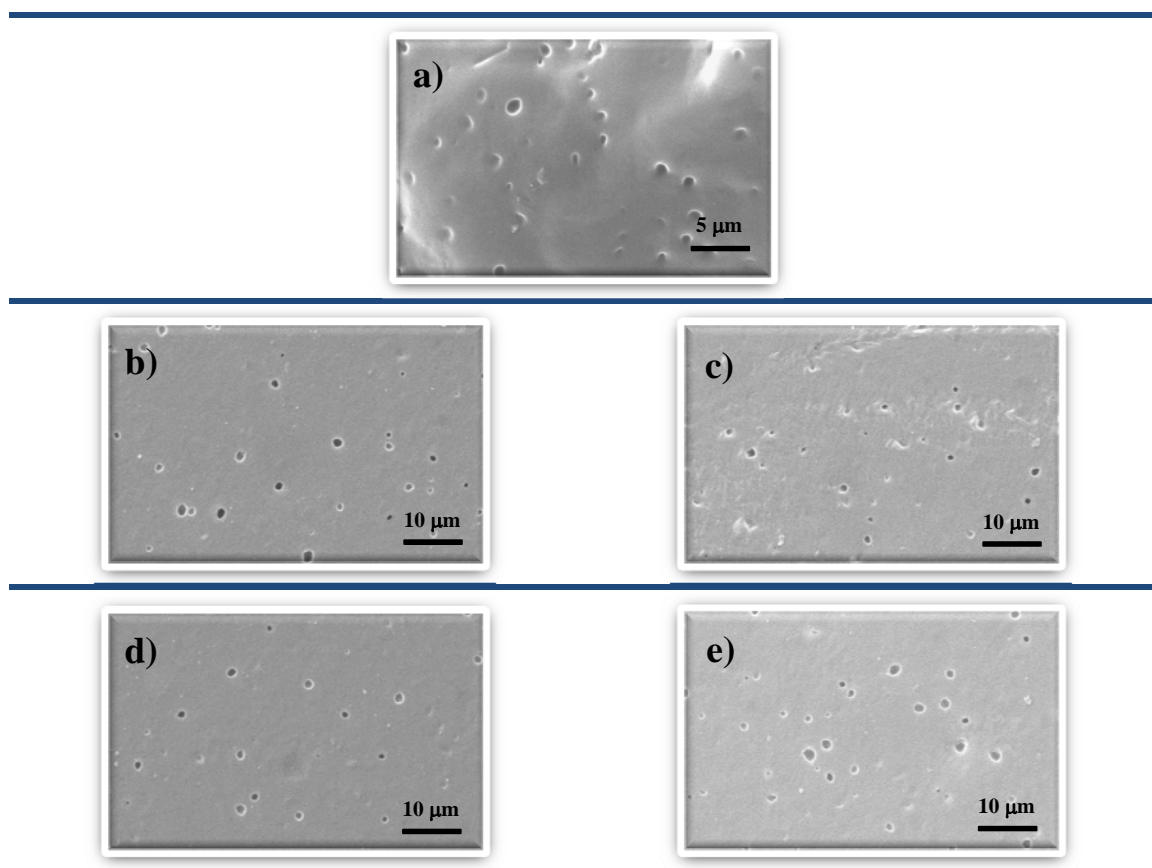


Figura III-12: Imágenes de SEM a 2000 X de las superficies de a) PHH-ref, b) PHHEA-220, c) PHHEA-2200, d) PHHEA-420 y e) PHHEA-4200.

La Figura III-12 muestra las fotografías para las muestras tratadas con la disolución acuosa. La película de referencia, Figura III-12 a), presenta poros en su superficie, que puede ser atribuidos a la evaporación del disolvente durante el proceso de obtención mediante el método de colada.⁴⁰

El tratamiento en medio acuoso parece no incrementar de modo apreciable y sistemático la rugosidad de las superficies, observándose pequeñas variaciones en función del tiempo de tratamiento. Tampoco se apreció un incremento en la cantidad o el tamaño de los poros en las superficies, lo cual fue observado en las muestras tratadas con IsoOH-ED (Figura III-13).

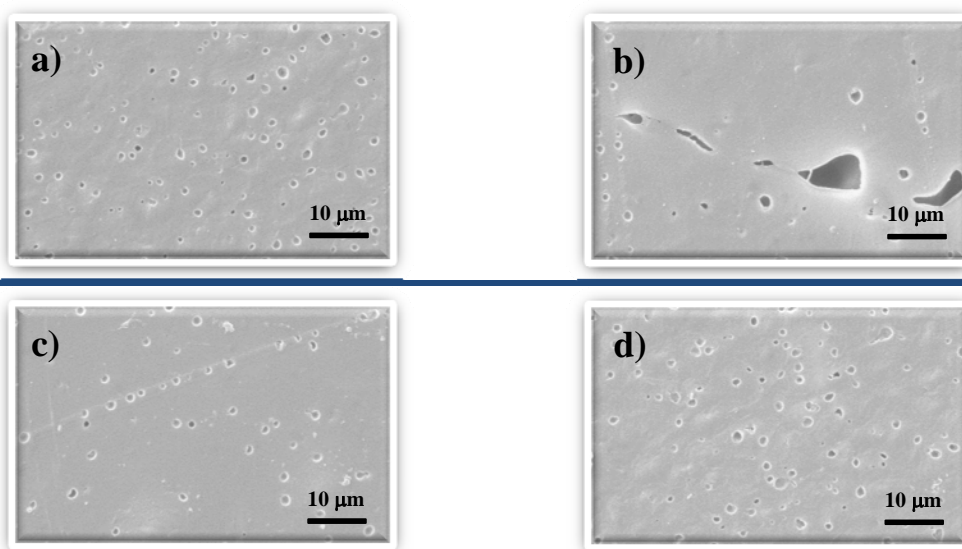


Figura III-10: Imágenes de SEM a 2000 X de las superficies de a) PHHEI-0.520, b) PHHEI-0.5200, c) PHHEI-220 y d) PHHEI-2200.

Estas superficies presentan mayor cantidad de poros que las películas de referencia (PHH-ref, Figura III-12 a)) con un aumento en la cantidad de los mismos, dependiendo del tiempo de tratamiento. No se observaron mediante SEM variaciones apreciables en la rugosidad superficial. En el caso de las muestras tratadas con una disolución IsoOH-ED al 5 %, tiempos de aminólisis prolongados (200 min, Figura III-13, b)) dan lugar a poros de gran tamaño, probablemente como consecuencia de la disolución de defectos en la película producidos durante la obtención por el método de colada.

Del mismo modo que para las muestras tratadas con IsoOH-ED, el tratamiento con hidróxido sódico origina la aparición de numerosos poros en las superficies poliméricas, Figura III-14.

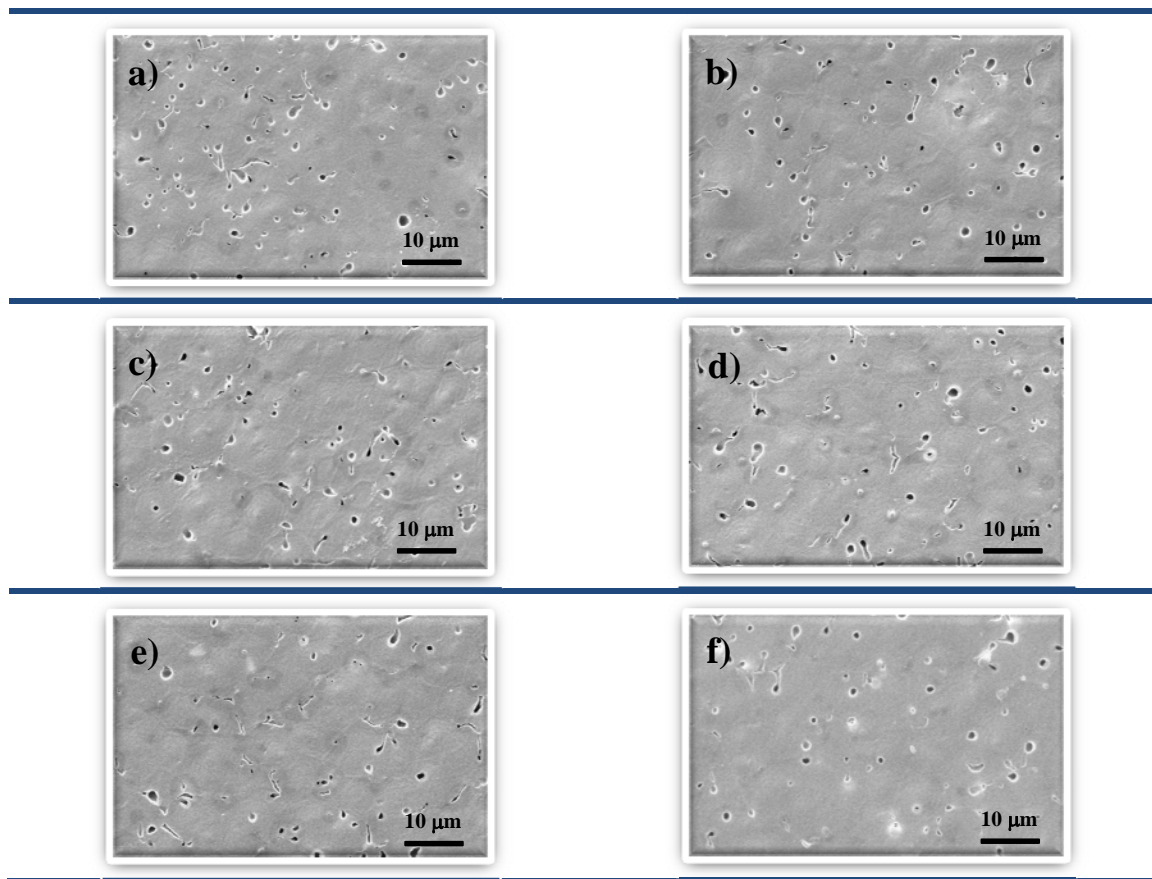


Figura III-14: Imágenes de SEM a 2000 X de las superficies de a) PHHN-0.2510, b) PHHN-0.2530, c) PHHN-0.510, d) PHHN-0.530, e) PHHN-110 y f) PHHN-130

La observación detallada de las imágenes de las muestras sometidas a los tratamientos que originan la menor reducción del ángulo de contacto, IsoOH-ED (Figura III-12) y NaOH (Figura III-14), presentan una gran cantidad de agujeros, lo que sugiere una fuerte degradación superficial. De hecho, resultados similares fueron observados por Shen y colaboradores¹³ para películas de P3HB3HHx con NaOH. De acuerdo con el modelo teórico de Wenzel, las superficies hidrofóbicas ($\theta > 90^\circ$) incrementarán su hidrofobicidad con el incremento de la rugosidad.⁴¹ De este modo, los altos valores del ángulo de contacto encontrados (apartado III-3.A.2.1.) para las superficies modificadas con IsoOH-ED y NaOH podría atribuirse a un incremento en la rugosidad superficial y no a un grado de modificación química bajo, que en el caso de

las muestras tratadas con IsoOH-ED se ha demostrado que es el más elevado mediante el ensayo de ninhidrina (apartado III-3.A.2.2.).

III-3.2.5. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS PELÍCULAS MEDIANTE ENSAYOS DE ESFUERZO-DEFORMACIÓN

Tal y como se ha indicado con anterioridad, los sustratos de P3HB3HHx se han modificado con el objeto de soportar células uroteliales. Así, un material sustitutivo de la vejiga, además de las características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y superficiales adecuadas, es importante que tenga propiedades mecánicas similares a las del tejido de vejiga nativo, puesto que se ha demostrado que las células son sensibles a las características mecánicas de los sustratos.^{42,43} Además, el biomaterial debe cubrir los requerimientos quirúrgicos que la aplicación exige; por ejemplo, la sutura a los tejidos adyacentes. Por estas razones, las propiedades mecánicas de los sustratos modificados se estudiaron, comparando las curvas de esfuerzo-deformación (σ - ε) del sustrato sin modificar con los sustratos modificados.

En las curvas esfuerzo-deformación se representa el alargamiento frente al esfuerzo de tracción como porcentaje de deformación, ε %:

$$\varepsilon \% = \frac{\Delta L}{L_0} \times 100 \quad [1]$$

La evaluación de la rigidez se determinó calculando el modulo elástico o módulo de Young, E , para todas las muestras, que es la relación entre el esfuerzo aplicado, σ , y la deformación, ε , resultante:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad [2]$$

El módulo elástico se calculó para deformaciones inferiores al 2-3 % en todos los casos, donde el comportamiento de las muestras es elástico; es decir, en esta zona las muestras recuperan su forma y dimensiones originales cuando desaparece la fuerza que produce la deformación.

La Figura III-15 muestra las curvas de esfuerzo-deformación para los sustratos tratados con ED en disolución acuosa y el P3HB3HHx sin modificar, PHH-ref. Se

observa que el tratamiento tiene poca influencia en las propiedades mecánicas de las películas cuando las muestras se tratan con la disolución más diluida, resultando en todos los casos las curvas típicas de materiales dúctiles. El módulo de Young de los sustratos no cambia para los tiempos de tratamiento estudiados y la elongación a rotura sólo disminuye en muestras tratadas durante 60 o más minutos (Tabla III-3).

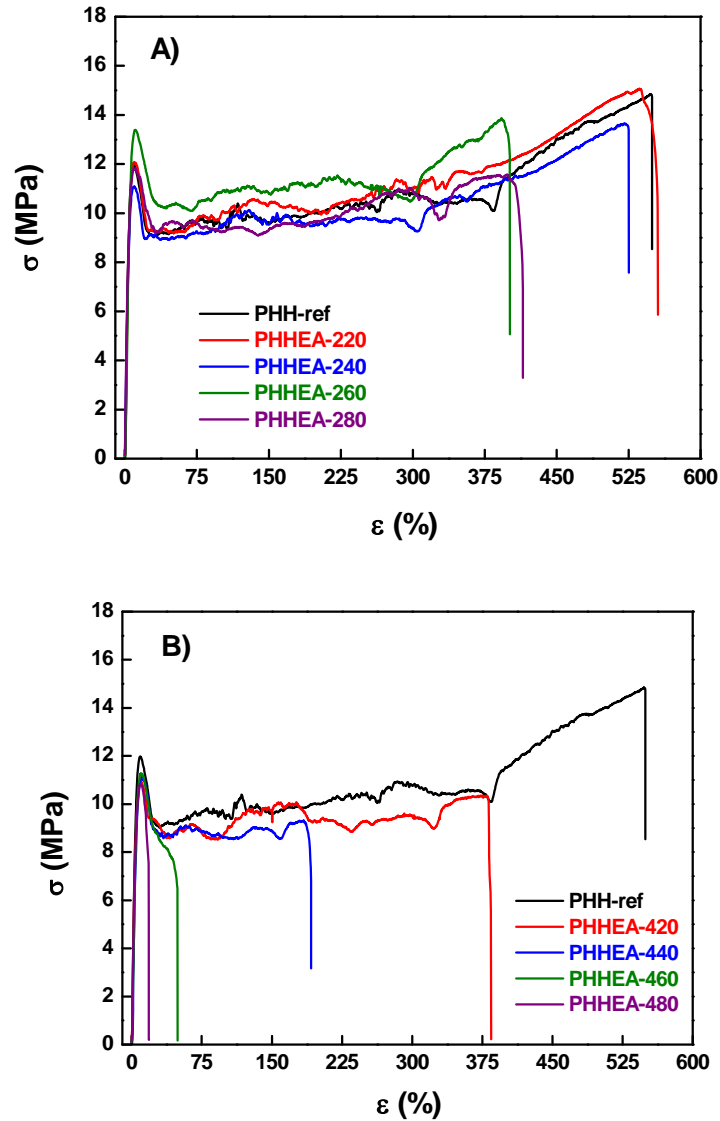


Figura III-15: Ensayos de esfuerzo deformación de A) muestras tratadas con disolución acuosa de ED al 20 % en volumen y B) muestras tratadas con disolución acuosa de ED al 40 % en volumen a los tiempos de tratamiento indicados en la figura.

Tabla III-3: Parámetros obtenidos de los ensayos σ - ε , para las películas tratadas con disolución acuosa de ED y la muestra de referencia.

Muestra	$\sigma_{m\acute{a}x}$ (Mpa)	ε_R (%)	σ_F (Mpa)	ε_F (%)	E (Mpa)
PHH-ref	13.8 \pm 0.9	531.2 \pm 39.4	11.6 \pm 0.6	9.1 \pm 0.9	221.8 \pm 23.7
PHHEA-220	15.0 \pm 1.0	528.0 \pm 29.9	11.6 \pm 0.9	10.3 \pm 1.0	229.2 \pm 20.7
PHHEA-240	13.1 \pm 2.4	481.6 \pm 125.0	11.2 \pm 0.2	10.1 \pm 0.8	208.8 \pm 23.2
PHHEA-260	16.2 \pm 4.9	438.1 \pm 85.4	12.9 \pm 0.5	10.9 \pm 0.2	224.8 \pm 13.7
PHHEA-280	12.7 \pm 1.0	413.1 \pm 28.7	12.2 \pm 0.3	10.5 \pm 0.6	242.3 \pm 20.9
PHHEA-420	11.3 \pm 1.3	433.1 \pm 75.2	11.1 \pm 0.3	10.1 \pm 0.2	217.7 \pm 4.6
PHHEA-440	11.0 \pm 0.2	200.9 \pm 23.9	11.0 \pm 0.2	10.9 \pm 0.3	208.7 \pm 35.0
PHHEA-460	11.4 \pm 0.1	51.9 \pm 5.8	11.4 \pm 0.1	10.3 \pm 0.9	213.3 \pm 16.8
PHHEA-480	11.7 \pm 0.7	24.0 \pm 4.7	11.7 \pm 0.7	9.9 \pm 0.8	239.6 \pm 17.1

Sin embargo, tal y como se observa en la Figura III-15 B), el incremento en la concentración de amina tiene un marcado efecto en las propiedades de las películas. Tratamientos cortos, de tan sólo 60 min, producen un cambio importante en el comportamiento de las películas, perdiendo su ductilidad y produciéndose la rotura inmediatamente después del punto de fluencia. Este comportamiento se aprecia en una mayor rigidez, con un ligero aumento de E , y de la fragilidad, con una marcada disminución de la elongación a rotura (Tabla III-3).

La alta reactividad de los sustratos en medio alcohólico, conlleva una disminución dramática de las propiedades mecánicas, tal y como se puede observar en la Figura III-16, en la que se ha suprimido la representación de PHH-ref por claridad.

El tratamiento modifica sustancialmente el comportamiento mecánico de las películas, con reducciones drásticas de la elongación máxima a rotura hasta valores cercanos o inferiores al punto de fluencia de las muestras. La degradación es independiente del tiempo de aminolisis, aunque tratamientos más largos producen, en general, mayor deterioro de las propiedades mecánicas

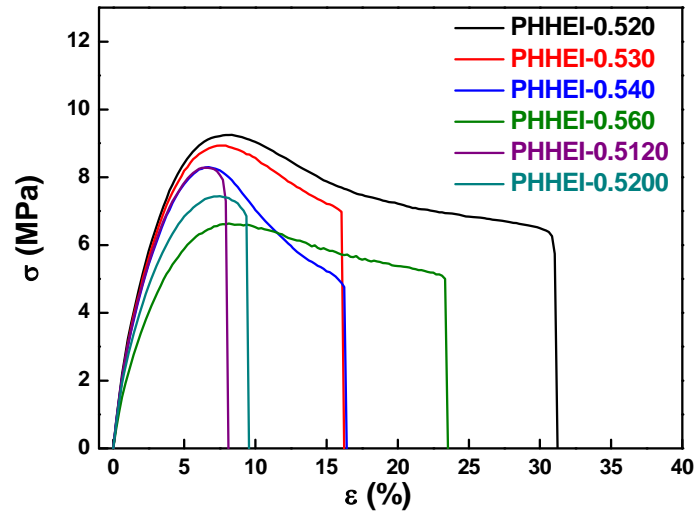


Figura III-16: Ensayos de esfuerzo deformación de las muestras tratadas con disolución de ED en isopropanol al 5 % en volumen.

En la Tabla III-4 se presentan los valores de las variables mecánicas determinados mediante ensayos de esfuerzo-deformación de las muestras tratadas con disolución de ED en isopropanol. Los valores de las muestras tratadas con la disolución más concentrada deben tomarse con cautela y ser considerados a modo orientativo, dada la dificultad encontrada para el troquelado de las probetas y al estar los valores cerca de los límites de error de la técnica. La manipulación de las muestras tratadas durante más de 60 minutos con la disolución de ED en isopropanol al 20 % fue imposible debido a su falta de estabilidad mecánica.

Tabla III-4: Parámetros obtenidos de los ensayos σ - ϵ , para las películas tratadas con disolución en isopropanol de ED y la referencia.

Muestra	σ_{\max} (Mpa)	ϵ_R (%)	σ_F (Mpa)	ϵ_F (%)	E (Mpa)
PHH-ref	13.8 ± 0.9	531.2 ± 39.4	11.6 ± 0.6	9.1 ± 0.9	221.8 ± 23.7
PHHEI-0.520	8.4 ± 1.2	26.5 ± 6.8	8.4 ± 1.2	8.6 ± 0.4	220.7 ± 2.3
PHHEI-0.530	8.3 ± 0.6	15.1 ± 2.4	8.3 ± 0.6	7.4 ± 0.3	199.7 ± 10.9
PHHEI-0.540	8.5 ± 0.3	15.8 ± 0.9	8.5 ± 0.3	7.1 ± 0.6	196.6 ± 10.5
PHHEI-0.560	7.4 ± 0.9	29.7 ± 5.3	7.4 ± 0.9	8.5 ± 0.5	170.0 ± 20.1
PHHEI-0.5120	8.5 ± 0.4	8.4 ± 0.2	8.5 ± 0.4	6.7 ± 0.6	193.3 ± 23.7
PHHEI-0.5200	7.4 ± 0.1	9.2 ± 0.7	7.4 ± 0.1	7.1 ± 0.4	179.3 ± 2.5
PHHEI-220	4.2 ± 1.2	4.3 ± 1.3	4.2 ± 1.2	2.7 ± 0.9	154.5 ± 6.9
PHHEI-230	4.5 ± 0.3	4.2 ± 0.8	4.5 ± 0.3	3.5 ± 0.2	161.1 ± 13.5
PHHEI-240	3.9 ± 0.6	3.2 ± 0.1	3.9 ± 0.6	2.7 ± 0.1	159.5 ± 15.3
PHHEI-260	4.0 ± 0.7	3.2 ± 0.1	4.0 ± 0.7	2.4 ± 0.1	162.4 ± 8.2

El alto grado de degradación mecánica se puede observar, a modo de ejemplo, en la enorme reducción de la elongación a rotura que para el tratamiento más suave, PHHEI-0.520, es ya en torno al 500 %. El aumento de la fragilidad es progresivo para las muestras tratadas con ED al 5 % en volumen, con reducciones progresivas de E en función del tiempo de tratamiento, siendo similar en todas las muestras que se analizaron después del tratamiento con la disolución al 20 % en volumen de ED.

El deterioro de las muestras tratadas con NaOH es tan marcado, que no fue posible la medida de las propiedades mecánicas, ya que su manejo, troquelado y realización de los ensayos de esfuerzo-deformación en el instron fue imposible, al encontrarse resquebrajadas después del tratamiento. El elevado deterioro observado hace inviable el uso de sustratos tratados con disolución de ED en isopropanol y con NaOH en las condiciones estudiadas en el presente capítulo, para la reparación o sustitución del tejido urotelial y de vejiga.

III-3.A.3. EVALUACIÓN DE LA UNIÓN COVALENTE DEL FRAGMENTO PEPTÍDICO DE LAMININA YIGSR

Teniendo en cuenta el balance entre el grado de modificación y las propiedades mecánicas, es evidente que el tratamiento en disolución acuosa con ED es el más adecuado para la aplicación buscada. Por ello, se seleccionaron dos sustratos de P3HB3HHx modificados con la disolución de ED en agua al 20 % en vol., durante 40 y 120 minutos, para unir covalentemente el fragmento peptídico de laminina YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg). Estas muestras presentan valores de funcionalización superficial suficientes para la unión covalente del fragmento peptídico, en función de los resultados obtenidos para sustratos similares de polihidroxialcanoatos.⁷ Se anticipa que esta secuencia actúe mejorando la adhesión y proliferación celular sobre los sustratos de P3HB3HHx tal y como se observó para los sustratos de P3HB3HV (Capítulo II).

La unión covalente del fragmento peptídico es superficial, por lo que puede influir en las características de humectabilidad de los sustratos. Así, en las muestras tratadas se evaluaron mediante medidas del ángulo de contacto por el método de la gota estática, Tabla III-5.

Tabla III-5: Valores de ángulo de contacto y concentración superficial de grupos amino para las muestras tratadas con disolución acuosa de ED al 20 % en volumen durante 40 y 120 minutos, antes y después de la unión covalente de YIGSR y de PHH-ref.

Muestra	Ángulo de Contacto (°)	Concentración de Grupos NH ₂ (μmol cm ⁻²)
PHH-ref	92.5 ± 1.9	0.000
PHHEA-240	88.4 ± 1.7	0.797
PHHEA-240-YIGSR	82.3 ± 3.9	0.849
PHHEA-2120	69.6 ± 1.9	1.716
PHHEA-2120-YIGSR	89.4 ± 0.5	3.563

Del mismo modo que para las películas precursoras, el ensayo de ninhidrina se empleó para valorar la presencia de grupos amino de la secuencia YIGSR unida covalentemente a la superficie de los sustratos. Se determinaron densidades amínicas de 0.85 y 3.56 μmol cm⁻² para las muestras modificadas durante 40 y 120 minutos, respectivamente. Estos resultados representan el balance entre la disminución de los grupos amino libres en la superficie, como consecuencia del proceso de reacción, y el incremento de los grupos amino presentes en los fragmentos YIGSR covalentemente unidos.

El efecto de la funcionalización con YIGSR se refleja también en la humectabilidad de las superficies. Una unión covalente de fragmentos YIGSR moderada, PHHEA-24-YIGSR, disminuye el ángulo de contacto. Esto puede atribuirse a la introducción de mayor número de grupos hidrofílicos presentes en YIGSR (amina, amida).

III-3.A.4. ENSAYOS CELULARES DE LOS SUSTRATOS DE P3HB3HHx MODIFICADOS

El comportamiento biológico de los sustratos de P3HB3HHx se estudió *in vitro* utilizando células uroteliales porcinas. Los cultivos celulares se analizaron con microscopía electrónica de barrido para valorar la morfología celular transcurridas 8 h desde el sembrado.

La Figura III-17 a) y b) muestra las células sembradas en las películas de P3HB3HHx sin modificar. La morfología celular en las películas sin modificar es esférica sin extensiones filopodiales, lo que sugiere una interacción débil con el sustrato,

pudiendo atribuirse este comportamiento a la alta hidrofobicidad de las películas, unido a la falta de funcionalidad en la superficie de las mismas.

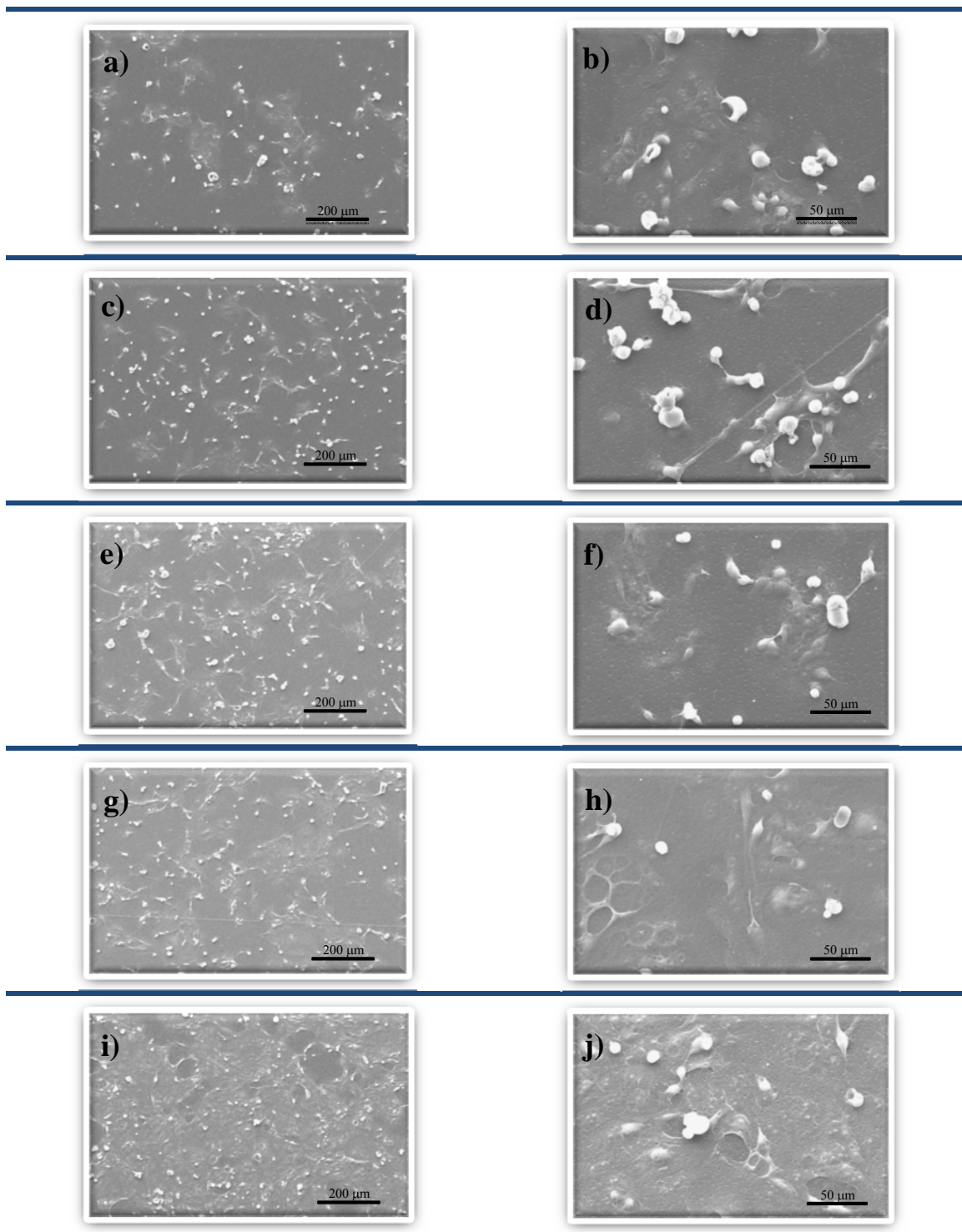


Figura III-17: Imágenes de SEM a 125X (columna izquierda) y 500X (columna derecha) de células uroteliales porcinas tras 8 h de cultivo en a-b) PHH-ref, c-d) PHHEA-240, e-f) PHHEA-2120, g-h) PHHEA-240-YIGSR y i-j) PHHEA-2120-YIGSR.

La Figura III-17 c-f) muestra las imágenes de SEM de las células después de 8 h de cultivo en los sustratos tratados con ED al 20 % durante 40 y 120 minutos. En estas películas se puede apreciar un ligero incremento en la interacción células-sustrato. De hecho, en comparación con el sustrato sin modificar, se puede apreciar un incremento en el número de células por campo de visión (Figura III-17 a), c) y e)). Además, las células muestran una forma menos esférica que las adheridas al polímero sin modificar, presentando algunas de ellas extensiones filopodiales, lo que sugiere una ligera mejora en su interacción con el sustrato. Esta pequeña mejoría puede atribuirse a la reducción del ángulo de contacto especialmente cuando la aminólisis se realiza durante 120 minutos, y a la introducción de nuevas funcionalidades amínicas que incrementan la interacción electrostática entre células y sustratos.

La morfología de las células adheridas a los sustratos modificados con ED y con el fragmento peptídico YIGSR se muestra en la Figura III-17 g-j). Estas imágenes muestran claramente como, en estas muestras, las células parecen ser capaces de reorganizar las matrices de sus membranas basales mediante fuerzas de atracción celular, dando lugar a la formación de densas redes celulares. Una comparación detallada entre las imágenes g) y h) (PHHEA-240-YIGSR) con las imágenes i) y j) (PHHEA-2120-YIGSR) permite observar que existe un incremento en el número de colonias celulares y sus conexiones. Esto indica que las muestras con una mayor cantidad de YIGSR, previamente tratadas con ED al 20 % en volumen durante 120 min, todavía exhiben una mejor interacción celular que las muestras con contenidos de YIGSR menores. Este resultado sugiere que la modificación de las superficies con fragmentos moleculares presentes en la matriz extracelular incrementa de modo apreciable la interacción células-sustrato, superior a cuando con el mismo objetivo se usan modificaciones químicas inespecíficas.

III-3.B. SUSTRATOS TRIDIMENSIONALES PARA REGENERACIÓN DE TEJIDO UROTELIAL

III-3.B.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los tratamientos químicos aplicados a las distintas muestras, así como la nomenclatura empleada a lo largo del presente capítulo, se presentan en la Tabla III-6.

Tabla III-6: Condiciones de modificación con ED y los distintos fragmentos peptídicos y nomenclatura empleada en el presente capítulo para los andamios tridimensionales.

Nomenclatura	Muestra de origen	Tiempo Tratamiento ED (s)	Fragmento Laminina
PHB10.4%HH-a1	PHB10.4%HH-a	30	No
PHB10.4%HH-a2		90	No
PHB10.4%HH-b1	PHB10.4%HH-b	30	No
PHB10.4%HH-b2		90	No
PHB14%HH-a1	PHB14%HH-a	30	No
PHB14%HH-a2		90	No
PHB14%HH-b1	PHB14%HH-b	30	No
PHB14%HH-b2		90	No
PHB10.4%HH-YIGSR	PHB10.4%HH-b	90	YIGSR
PHB10.4%HH-Cis		90	cis laminina A
PHB14%HH-YIGSR	PHB14%HH-b	90	YIGSR

III-3.B.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS

El análisis de las características químico-física de los andamios 3D sintetizados y de las modificaciones realizadas sobre ellos, se llevó a cabo mediante las técnicas descritas en el apartado Metodología Experimental. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

III-3.B.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La relación agua-disolvente-surfactante puede influir en el aspecto poroso de las muestras obtenidas mediante el método de emulsión-liofilización.^{23,27} Por tanto, para evaluar la bondad del procedimiento de obtención se observó un corte transversal de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido, y las imágenes obtenidas se presentan en la Figura III-18.

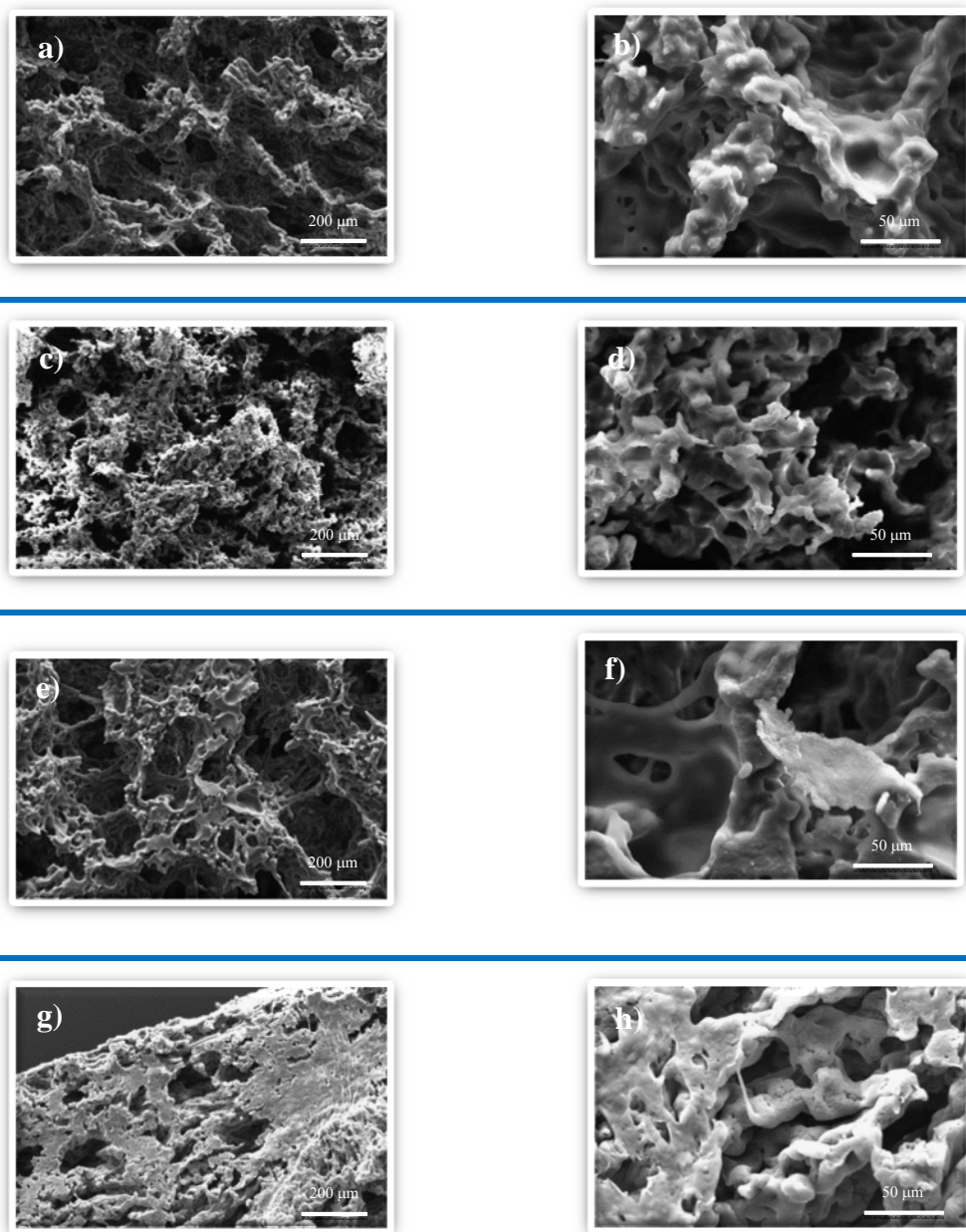


Figura III-18: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de un corte transversal a 100X (1) y 500X (2) de a,b) PHB10.4HH-a, c,d) PHB10.4HH-b, e,f) PHB14HH-a y g,h) PHB14HH-b.

A excepción de para el andamio PHB14HH-b, en todos los casos se obtuvo una estructura porosa homogénea, con una regularidad y reproducibilidad superior a la observada para los andamios obtenidos por el método de lixiviación de partículas.²²

También se ha observado que la estructura de estos andamios es más compacta que para andamios de otros polímeros biodegradables obtenidos por el mismo método.⁴⁴

El aumento de la cantidad de agua añadida durante el proceso de formación influye negativamente en la obtención de los andamios altamente porosos (Figura III-18, a,b) y g,h)), dando lugar a estructuras más cerradas, con paredes más gruesas, llegando a producir el colapso de la estructura para el caso de la muestra PHB14HH-b. Este efecto puede atribuirse a la alta hidrofobicidad de los copolímeros de partida, que da lugar a la separación de fases durante el proceso de obtención que no pudo ser contrarrestada por la cantidad de surfactante añadida cuando aumenta la cantidad de agua.

La influencia de la cantidad de copolímero de 3HHx en el polímero empleado también se aprecia en la morfología superficial de los andamios, con superficies en general más lisas y menos rugosas como consecuencia del aumento de la cantidad de 3HHx. Así, las imágenes de las muestras PHB10.4HH-a y PHB10.4HH-b, parecen mostrar paredes más rugosas. Una comparación entre las imágenes b y f muestra con mayor detalle las diferencias, con la presencia de mayor cantidad de superficies lisas para el caso de la muestra f. Este hecho puede deberse a la mayor hidrofobicidad del copolímero con 14 % molar de HHx con respecto al copolímero con el 10.4 % molar, tal y como se deduce de los valores medidos de ángulo de contacto para películas de este copolímero obtenidas por el método de colada ($\text{PHB10.4\%HHx} = 87.4^\circ$ y $\text{PHB14\%HHx} = 92.5^\circ$; Capítulo, apartado IV-3.5.).

Si se realiza una observación detallada de las imágenes se pueden apreciar las diferencias entre los poros presentes en los distintos tipos de andamios. Para la muestra PHB10.4%HH-a se observaron poros de dos tamaños homogéneamente distribuidos, mientras que en la muestra PHB10.4%HH-b se apreciaron principalmente poros de gran tamaño heterogéneamente distribuidos.

En el caso de las muestras PHB14%HH se observaron poros de gran tamaño homogéneamente distribuidos, con la presencia de una pequeña cantidad de poros de menor tamaño para la muestra PHB14%HH-a. En el caso de la muestra PHB14%HH-b los poros pueden ser considerados como orificios en la estructura continua obtenida por el colapso de la estructura provocada por la cantidad de agua añadida.

El tratamiento con ED está encaminado a introducir grupos funcionales en la superficie de las muestras, lo que puede provocar cambios sustanciales en la morfología superficial de los mismos. Las Figuras III-19 y III-20, muestran las superficies de los andamios tratados con ED.

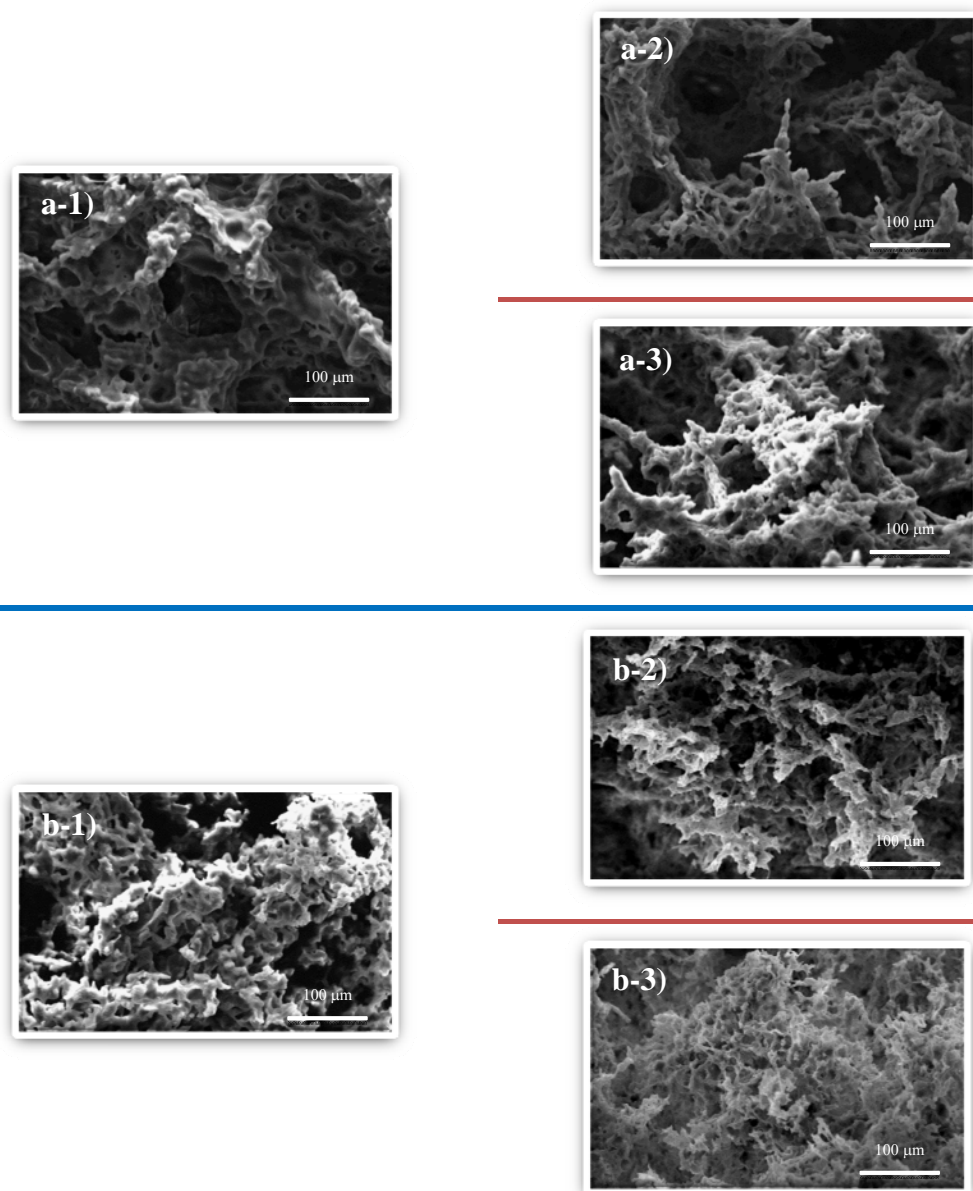


Figura III-19: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de un corte transversal a 250X de las muestras modificadas con ED de los andamios con el copolímero PHB10.4%HH para a) andamios PHB10.4%HH-a y sus modificaciones con ED y b) andamios PHB14%HH-b y sus modificaciones con ED.

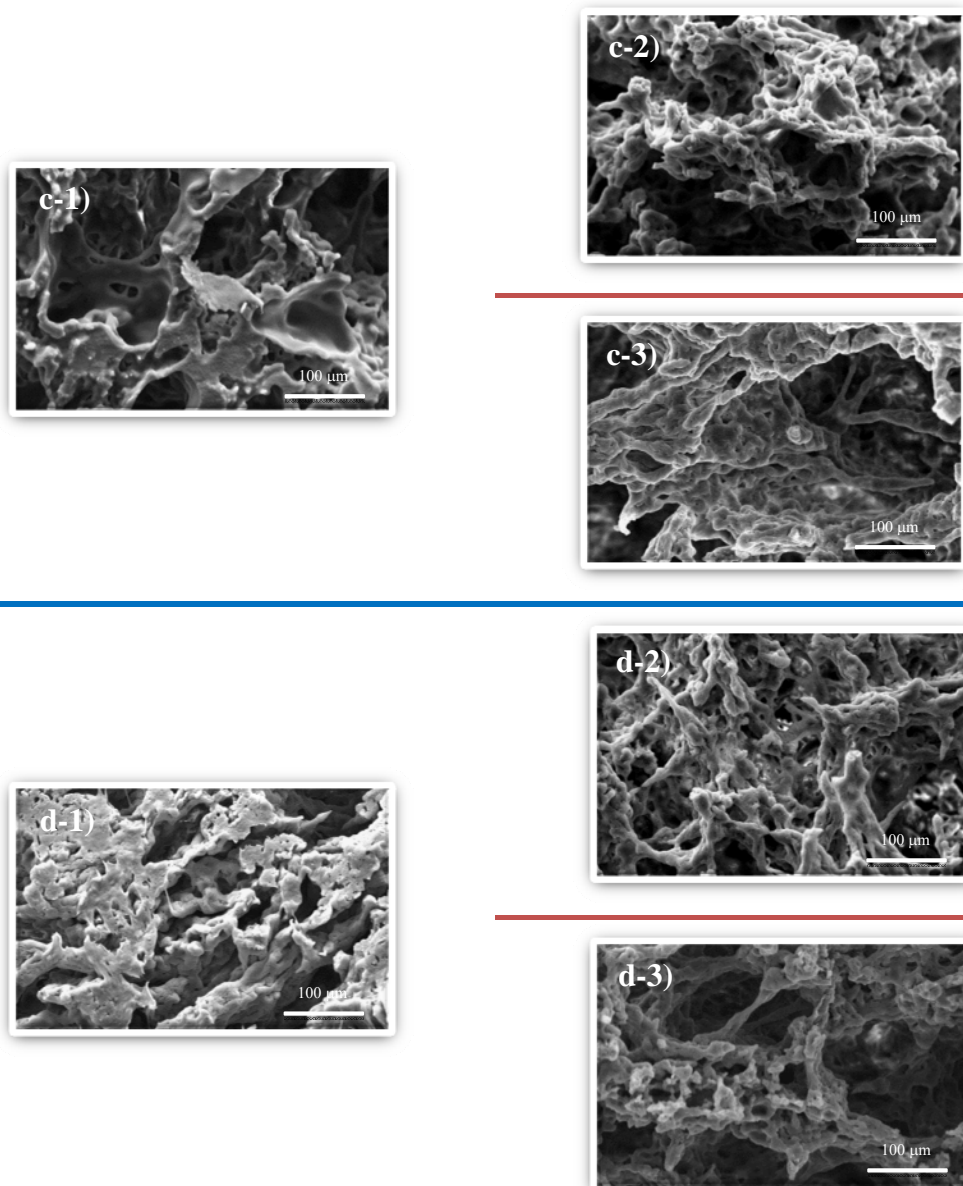


Figura III-20: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de un corte transversal a 250X de las muestras modificadas con ED de los andamios con el copolímero PHB14%HH para c) andamios PHB14%HH-a y sus modificaciones con ED y d) andamios PHB14%HH-b y sus modificaciones con ED.

Tal y como cabría esperar como consecuencia de la elevada reactividad de la ED en medio alcohólico con los PHAs empleados, el tratamiento superficial conduce a variaciones en el aspecto de los andamios. Parece que el tratamiento superficial modifica la rugosidad de las muestras (Figura III-19), con un ligero aumento de la misma tras el tratamiento químico (a-2, a-3, b-2, b-3), posiblemente como consecuencia

de que el tratamiento rompe parcialmente las paredes de los andamios, pero no se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos a 30 o 90 s, no evidenciándose grandes influencias del tiempo de tratamiento.

Las variaciones observadas en la superficie de las muestras de PHB10.4%HHx también se apreciaron en las muestras de PHB14%HH, Figura III-20, con ligeros incrementos en la rugosidad y sin variaciones remarcables atribuibles al tiempo de tratamiento. En el caso concreto de la muestra PHB14%HH-b (d, Figura III-20), el tratamiento químico parece romper la estructura compacta de la muestra, dando lugar a un mayor número de orificios, no apreciados en la muestra original.

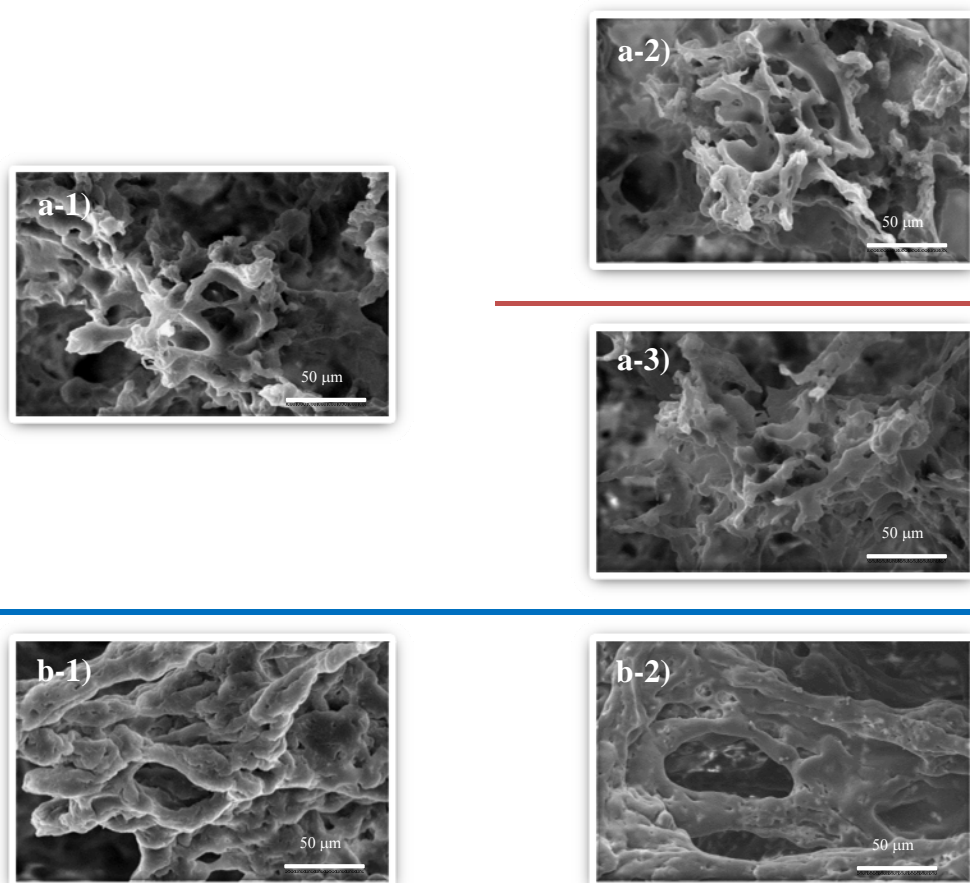


Figura III-21: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de un corte transversal a 500X de las muestras modificadas con ED y laminina para a) andamios PHB10.4HH-a y sus modificaciones con laminina, b) andamios PHB14HH-a y su modificación con laminina.

Los grupos amino introducidos mediante la funcionalización con amina se emplearon para anclar superficialmente fragmentos peptídicos de laminina. Dado que

este proceso de funcionalización es superficial, podría influir en la superficie de las muestras, y las posibles variaciones en la morfología superficial se analizaron mediante SEM, mostrándose las imágenes obtenidas en la Figura III-21.

El aspecto de las muestras antes y después de la reacción con laminina parece similar, indicando la baja influencia en la superficie del tratamiento de funcionalización. Esta mínima influencia puede atribuirse a que el medio de reacción es acuoso y a la baja reactividad de los fragmentos de laminina, que limitan la reactividad con la superficie polimérica.

Por tanto, a la vista de las imágenes de microscopía electrónica de barrido, se puede concluir que el tratamiento con ED aumenta parcialmente la rugosidad de las superficies de las muestras, independientemente del tipo de muestra y del tiempo de tratamiento. Igualmente, es posible concluir que no se aprecian cambios superficiales tras el tratamiento con laminina, ni en función del fragmento de laminina empleado ni del copolímero constituyente de la muestra.

III-3.B.2.2. PICNOMETRÍA DE HELIO Y DETERMINACIÓN DE LA POROSIDAD DE LOS ANDAMIOS

La picnometría de He permitió, mediante medidas rápidas y precisas, la determinación de la densidad de las muestras, obteniéndose los valores presentados en la tabla III-7.

Tabla III-7: Valores de densidad determinados por porosimetría de helio.

Muestra	ρ (g cm ⁻³)
PHB10.4%HH-a	1.2717 ± 0.0713
PHB10.4%HH-a1	1.2781 ± 0.0793
PHB10.4%HH-a2	1.3103 ± 0.0522
PHB10.4%HH-YIGSR	1.2584 ± 0.0808
PHB10.4%HH-Cis	1.2201 ± 0.0599
PHB10.4%HH-b	1.2106 ± 0.0193
PHB10.4%HH-b1	1.3954 ± 0.0296
PHB10.4%HH-b2	1.3051 ± 0.0609
PHB14%HH-a	1.2351 ± 0.0363
PHB14%HH-a1	1.2755 ± 0.0370
PHB14%HH-a2	1.2985 ± 0.0266
PHB14%HH-YIGSR	1.2123 ± 0.0380
PHB14%HH-b	1.2044 ± 0.0052
PHB14%HH-b1	1.2980 ± 0.0280
PHB14%HH-b2	1.3018 ± 0.0154

Si se comparan los andamios originales, se observa una menor densidad de las muestras obtenidas con el copolímero con el 14 % de 3HHx y con la mayor cantidad de agua. Ambos efectos podrían estar relacionados con la diferente hidrofobicidad de los copolímeros que intervendría en la estabilidad de las fases orgánica-acuosa durante el proceso de obtención.

A partir de la ecuación [4], y de los valores de la densidad aparente (ρ) y densidad en masa (ρ_0) se determinó la porosidad de los andamios sin tratamiento, los tratados con ED y los funcionalizados con los distintos fragmentos peptídicos de laminina. Tal y como se ha indicado en el apartado de metodología experimental, la densidad aparente se determinó a partir de las medidas de las dimensiones y del pesaje de tres especímenes diferentes de cada tipo de andamio estudiado. A partir de estos valores y empleando $\rho_0 = 1.2226 \text{ g cm}^{-3}$ para el copolímero PHB10.4HH y $\rho_0 = 1.2214 \text{ g cm}^{-3}$ para el copolímero P3HB14HH, determinados a partir de las medidas de picnometría de He, se determinaron los valores de porosidad mostrados en la tabla III-8:

Tabla III-8: Valores de porosidad de los andamios calculados en función de su densidad aparente y en masa.

Muestra	Porosidad (%)
PHB10.4%HH-a	91.8 ± 0.3
PHB10.4%HH-a1	90.4 ± 2.1
PHB10.4%HH-a2	88.9 ± 0.7
PHB10.4%HH-YIGSR	66.3 ± 1.1
PHB10.4%HH-Cis	72.8 ± 2.1
PHB10.4%HH-b	92.6 ± 0.5
PHB10.4%HH-b1	90.6 ± 3.5
PHB10.4%HH-b2	92.6 ± 0.2
PHB14%HH-a	88.8 ± 2.1
PHB14%HH-a1	88.2 ± 0.5
PHB14%HH-a2	88.9 ± 1.7
PHB14%HH-YIGSR	64.4 ± 1.6
PHB14%HH-b	87.6 ± 2.2
PHB14%HH-b1	84.5 ± 3.2
PHB14%HH-b2	79.0 ± 2.6

La porosidad de las muestras originales está en torno al 92 % y el 88 % (dependiendo del copolímero empleado), lo que representa valores ligeramente

superiores a otros andamios tridimensionales empleados para ingeniería tisular de vejiga, cuya porosidad ha sido determinado mediante este método.¹⁹

Los valores obtenidos, y teniendo en cuenta el valor de la desviación estándar para las medidas realizadas, no permitieron determinar la existencia de cambios en la porosidad como consecuencia de las variaciones en la cantidad de agua añadida durante el proceso de obtención, con valores de porosidad más pequeños para las muestras con el copolímero con el 14 % de 3HHx. Estos cambios podrían deberse a la peor interacción fase orgánica-fase acuosa debido a la mayor hidrofobicidad de este copolímero, tal y como se ha indicado con anterioridad.

La modificación superficial con ED no produce variación significativa en la porosidad de las muestras, a excepción de para las muestras PHB14%HH-b, donde el tratamiento con ED produce una disminución de la porosidad. Este cambio en la estructura de este tipo de andamios tiene concordancia con las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica de barrido (apartado III-3.B.2.1., Figura III-20), donde se apreció un aumento en la degradación tras el tratamiento químico con ED, con rotura de las paredes del andamio. Tal y como se determinó por porosimetría de mercurio (apartado III-3.B.2.3.) el tratamiento con ED de los andamios PHB14%HH-b produce una disminución de tamaño medio de poro, indicando que se han eliminado los poros de mayor tamaño, eliminación que podría explicar la reducción de la porosidad determinada para estos especímenes.

III-3.B.2.3. POROSIMETRÍA DE INTRUSIÓN DE MERCURIO

La macro y microporosidad, así como la interconexión, son factores de gran importancia en la promoción del crecimiento tisular, vascularización, y la cesión de nutrientes a través del nuevo tejido formado. La evaluación de la porosidad se realizó mediante porosimetría de intrusión de mercurio. Todas las muestras originales, las tratadas con ED y las modificadas con los fragmentos peptídicos de laminina se analizaron mediante el empleo de esta técnica. Los valores de la presión de intrusión se relacionan automáticamente con el tamaño de poro utilizando la ecuación de Washburn, y el resultado de la representación de los resultados obtenidos es el mostrado en la Figura III-22:

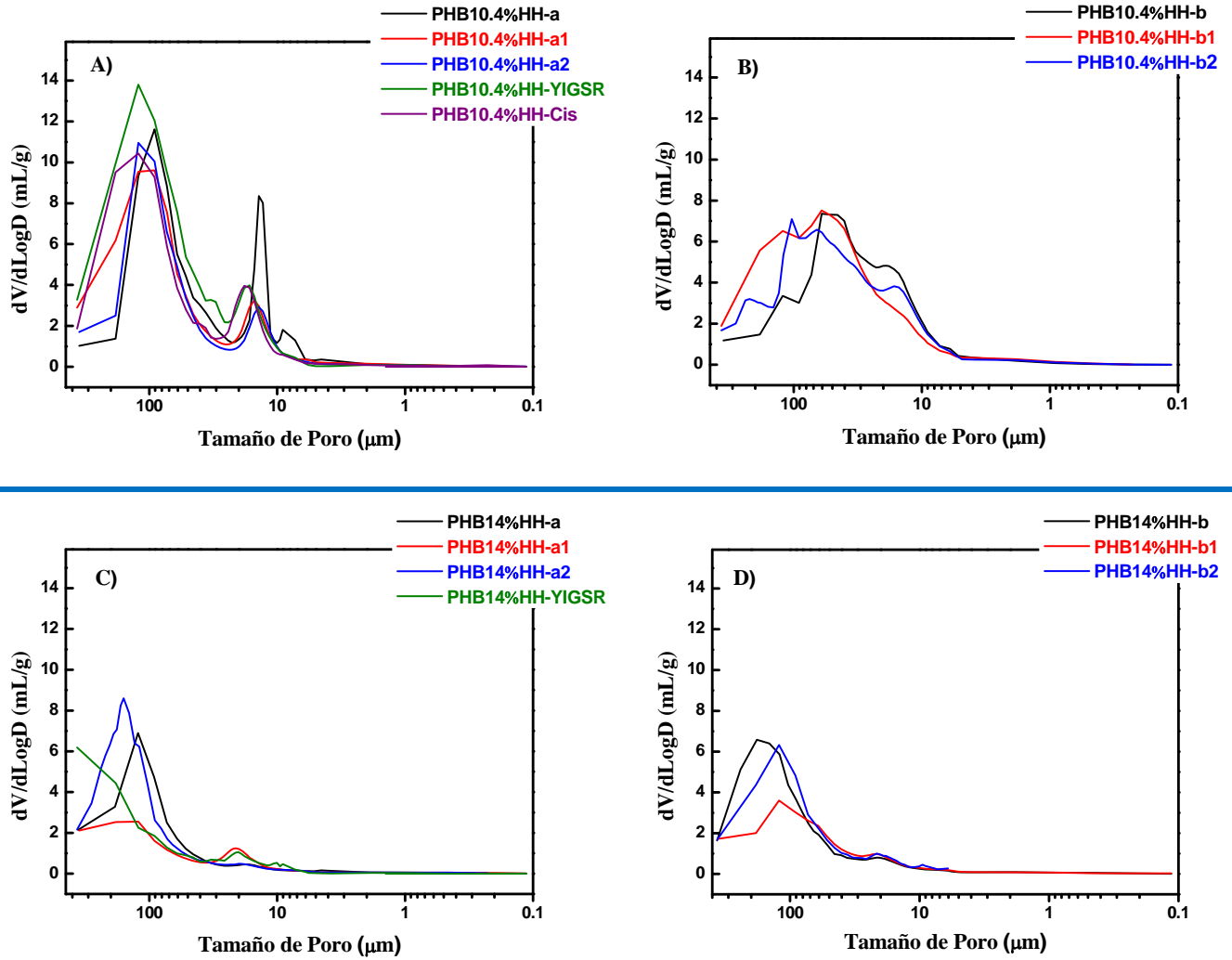


Figura III-22: Distribución del tamaño de poro de los andamios obtenidos por el método de emulsión-liofilización y de las muestras tratadas químicamente con ED y funcionalizadas con laminina, determinada mediante porosimetría de intrusión de mercurio. A) PHB10.4%HH-a andamios; B) PHB10.4%HH-b andamios; PHB14%HH-a andamios; D) PHB14%HH-b andamios.

Todas las muestras del copolímero PHB10.4%HH tratadas durante 30 s (Figura III-22, A) presentan la misma distribución de poros, con dos tamaños claramente diferenciados, con una mayor acumulación de poros de mayor tamaño. Este efecto no se aprecia de igual modo cuando la cantidad de agua se incrementa durante el proceso de obtención con el mismo copolímero (Figura III-22, B), donde la acumulación de poros es monomodal y no gaussiana con un hombro en algunos casos para la distribución de poros de menor tamaño.

Para el caso de los andamios obtenidos con el copolímero con el 14% de 3HHx (Figura III-22, C y D), se aprecia una distribución gaussiana para la distribución de poros de mayor tamaño, con la formación de pequeños poros en algunas muestras, que no siguen ningún patrón de comportamiento.

Las distribuciones de poros medidas mediante MIP están relacionadas con el aspecto de los andamios observado mediante SEM (apartado III-3.B.2.1.).

Tabla III-9: Valores de tamaño de poro determinados mediante porosimetría de intrusión de mercurio.

Muestra	Tamaño Medio de Poro (μm)	Tamaño de Poro Grande (μm)	Tamaño de Poro Pequeño (μm)
PHB10.4%HH-a	74.9	91.2	13.9
PHB10.4%HH-a1	111.1	106.6	15.1
PHB10.4%HH-a2	95.2	106.5	13.9
PHB10.4%HH-YIGSR	110.9	121.9	16.5
PHB10.4%HH-Cis	117.1	121.9	18.1
PHB10.4%HH-b	40.8	51.9	19.1
PHB10.4%HH-b1	70.1	60.7	-
PHB10.4%HH-b2	92.4	65.9	16.5
PHB14%HH-a	102.5	122.8	18.2
PHB14%HH-a1	125.9	121.8	21.3
PHB14%HH-a2	168.9	159.1	19.1
PHB14%HH-YIGSR	285.4	-	20.2
PHB14%HH-b	150.5	163.2	21.3
PHB14%HH-b1	95.1	121.9	21.3
PHB14%HH-b2	46.0	121.9	21.3

El pico asociado a los poros de menor tamaño se produce en torno a 10 psi de presión aplicada en todos los casos, lo que podría ser un indicativo de la resistencia mecánica de los andamios, que se comprimirían a esa presión de inyección, dando lugar al pico observado.

Dado que el tamaño medio de poro se determina a partir de los valores medidos en todo el rango de presión estudiado, podría estar ligeramente influenciado por la compresión del andamio anteriormente indicada a 10 psi. De modo general se puede decir que aumenta con el tratamiento químico. Este mismo comportamiento se observa para el tamaño de los poros más grandes.

Como se observa en la Tabla III-9, la tendencia general del valor del tamaño de poro grande aumenta ligeramente para todas las muestras, a excepción de las muestras de PHB14%HH-b, como consecuencia del tratamiento químico con ED. Esta variación indicaría la degradación de los andamios, incluso para los bajos tiempos de tratamiento, dada la alta reactividad de la etilendiamina en medio alcohólico con los sustratos de P3HAs.

El mismo comportamiento se observó para los valores del tamaño de poro medio, mientras que el tamaño de poro pequeño no se modifica sustancialmente en ninguno de los casos estudiados.

En todos los casos se produce un aumento del tamaño de poro tras el tratamiento con laminina. Dado que no se observó una degradación superficial evidente mediante SEM para estas muestras (Figura III-21, apartado III-3.B.2.1), el aumento del tamaño de poro podría estar provocado por la degradación como consecuencia del tratamiento mecánico asociado al proceso de funcionalización (agitación magnética, manipulación...).

III-3.B.2.4. ANÁLISIS TERMO MECANODINÁMICO

Las propiedades mecánicas de las muestras se analizaron mediante ensayos de compresión, midiéndose el módulo de pérdida y el módulo de almacenamiento. La Figura III-23, muestra el módulo de almacenamiento y de pérdida para las muestras sin tratar y tratadas con ED.

Los andamios obtenidos con el copolímero con el 14 % en mol de 3HHx presentan valores de ambos módulos, de modo general, superiores a los de los andamios obtenidos con el copolímero con el 10.4 % en mol de 3HHx. Este comportamiento puede deberse a que los andamios PHB14%HH muestran una menor porosidad, con paredes que pueden ser más gruesas, dando como resultado una estructura más estable mecánicamente.

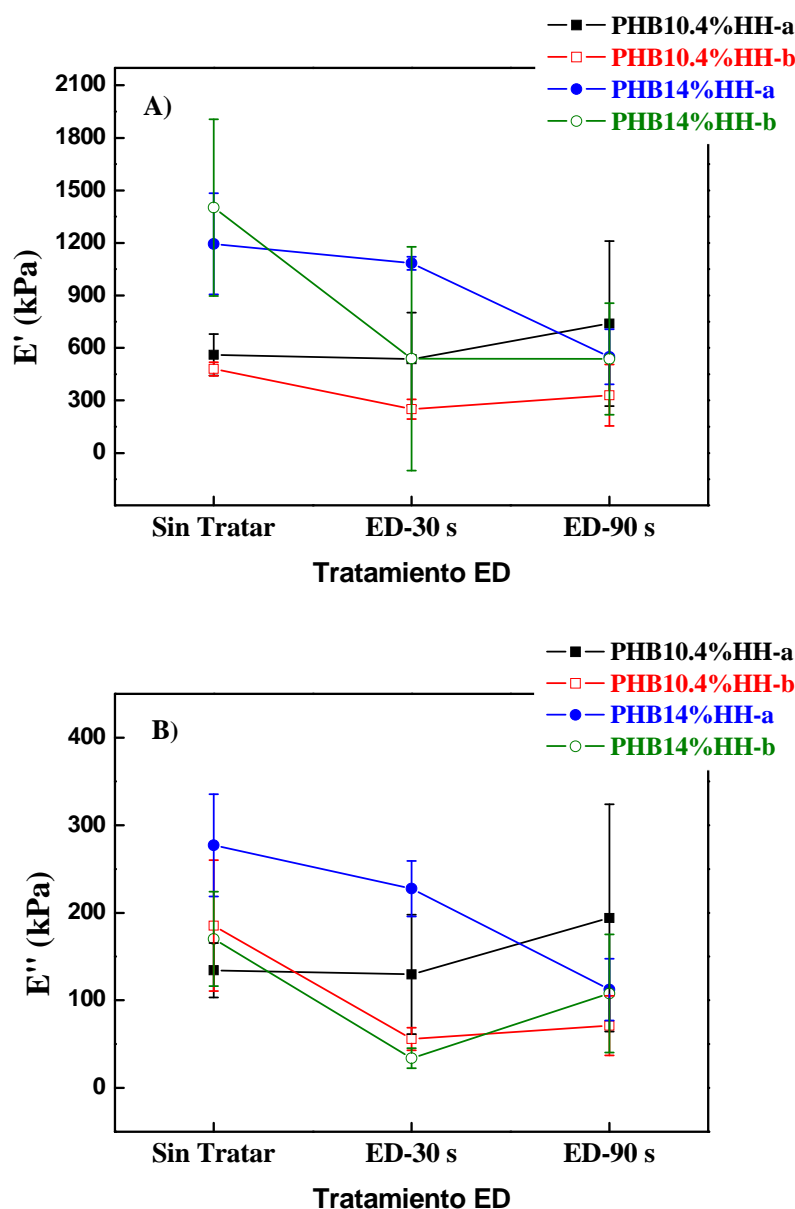


Figura III-23: E' A) y E'' B), para los andamios tratados con ED y sin tratar, obtenidos mediante ensayos DMTA de compresión medidos a 37 °C.

Atendiendo al tratamiento químico, es posible observar una ligera disminución de los módulos (E' y E''), para los andamios de PHB14%HH, con respecto a los andamios sin tratar, empleados como referencia. Esta disminución indica un ligero aumento de la fragilidad de los andamios tridimensionales como consecuencia del tratamiento, sin que exista una dependencia del tiempo de tratamiento. A pesar de que el tiempo de tratamiento es corto, las propiedades mecánicas se ven afectadas como consecuencia de la alta reactividad de la ED con los copolímeros empleados en medio

alcohólico, lo que unido a la alta superficie específica de los andamios altamente porosos accesible al tratamiento, hace que la estructura del material se vea afectada.

En el caso del andamio PHB10.4%HH-a se observó un aumento de los valores de ambos módulos con el tiempo de tratamiento respecto al andamio sin tratamiento. El aumento de la cristalinidad de las cadenas poliméricas constituyentes del andamio puede producir el incremento en los valores de módulo medido, pero dado que no se realizó ningún estudio de cristalinidad de las muestras antes y después de los tratamientos, no es posible atribuir este aumento a dicho efecto. Sin embargo, es bien conocido que la mayor cantidad de P3HB en el copolímero aumenta su cristalinidad (valores experimentales de DSC para los copolímeros estudiados en el apartado “IV-3.2. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES TÉRMICAS DE LOS BIOCOMPOSITES MEDIANTE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO” y el subapartado “V-3.3.2.2. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO” de los capítulos IV y V respectivamente). La mayor cantidad de P3HB puede dar lugar a procesos de cristalización secundaria que aumentan el envejecimiento del sustrato y por tanto los valores de E' y E'' observados para el andamio del copolímero con el 10.4 % de 3HHx.

Tabla III-6: Valores de E' y E'' para las muestras antes y después del tratamiento químico con ED y la funcionalización con laminina.

Muestra	Módulo de Almacenamiento E' (kPa)	Módulo de Pérdida E'' (kPa)
PHB10.4%HH-a	561.1 ± 118.5	134.3 ± 31.1
PHB10.4%HH-a1	535.9 ± 265.7	129.6 ± 68.1
PHB10.4%HH-a2	738.8 ± 471.0	194.1 ± 129.8
PHB10.4%HH-YIGSR	653.6 ± 396.2	156.1 ± 101.0
PHB10.4%HH-Cis	1209.0 ± 633.2	279.0 ± 119.5
PHB10.4%HH-b	480.0 ± 38.7	185.3 ± 74.8
PHB10.4%HH-b1	250.7 ± 56.2	56.0 ± 12.9
PHB10.4%HH-b2	330.0 ± 175.5	71.1 ± 34.0
PHB14%HH-a	1194.6 ± 289.4	277.0 ± 58.4
PHB14%HH-a1	1083.9 ± 37.0	227.6 ± 31.7
PHB14%HH-a2	549.7 ± 157.5	112.3 ± 35.3
PHB14%HH-YIGSR	2006.7 ± 358.1	340.7 ± 81.9
PHB14%HH-b	1401.7 ± 505.0	170.1 ± 53.9
PHB14%HH-b1	538.4 ± 639.1	33.9 ± 11.4
PHB14%HH-b2	537.4 ± 318.8	107.8 ± 67.4

La Tabla III-10 muestra todos los valores de E' y E'' para las muestras antes y después del tratamiento químico con ED a los dos tiempos bajo estudio, y tras el anclaje de los distintos fragmentos peptídicos.

Para ambos tipos de andamios, PHB10.4%HH y PHB14%HH, la unión covalente de la laminina (de modo independiente del fragmento peptídico empleado, YIGSR o cadena de cis laminina A) aumenta sustancialmente los valores de ambos módulos.

Los valores de E' en todos los casos son superiores a los determinados mediante ensayos de esfuerzo-deformación para vejiga humana,⁴⁵ siendo el valor más cercano el de la muestra PHB10.4%HH-b1.

III-3.B.2.5. ENSAYO DE NINHIDRINA

Los resultados de la cuantificación de los grupos NH_2 por unidad de masa se muestran en la Figura III-24, para las muestras tratadas con ED a ambos tiempos.

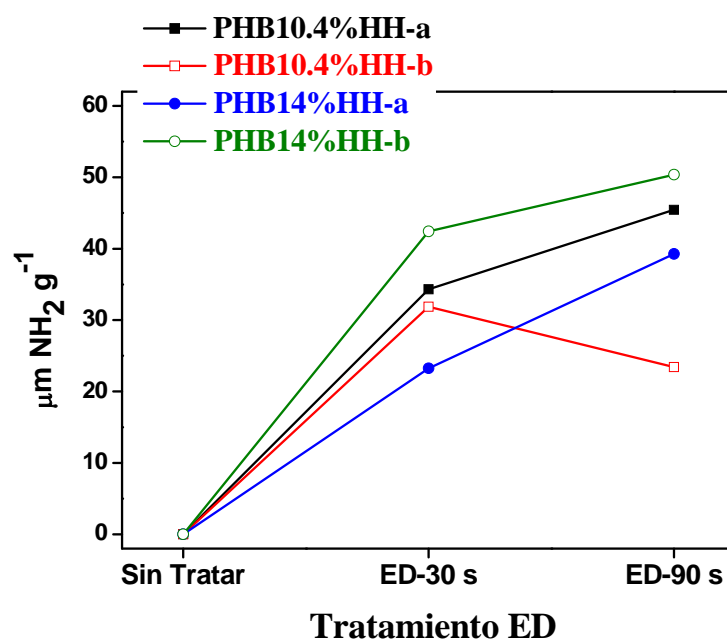


Figura III-24: Densidad superficial de grupos amino determinada mediante el ensayo de ninhidrina para los andamios P3HB3HHx tratados con disolución de ED en isopropanol.

Todas las muestras tienen valores superiores a los de los respectivos blancos, con incrementos dependientes del tiempo de tratamientos excepto para la muestra PHB10.4%HH-b (Figura III-10 y Tabla III-7), donde se produce una reducción de la

funcionalización con el tiempo. Este hecho puede deberse al inicio de la disolución de la muestra, llegando a un equilibrio entre la formación de grupos amino y la disolución de las cadenas poliméricas que daría lugar a la disminución de grupos amino en la superficie del andamio. Sin embargo, este comportamiento no ha sido determinado por ninguna de las técnicas de caracterización empleadas en este capítulo, no apreciándose una degradación excesiva o un comportamiento disonante con el resto de muestras.

Cuanto mayor es la cantidad de agua empleada en la síntesis, mayor es la cantidad de funcionalizaciones introducidas, dando lugar a una mayor funcionalización de las muestras PHB10.4%HH-b y PHB14%HH-b.

Las mayores funcionalizaciones se consiguieron para la muestra PHB14%HH-b, lo que puede explicar los cambios morfológicos y las variaciones en el tamaño de poro asociados a la mayor degradación superficial, como consecuencia de la mayor efectividad del tratamiento de aminólisis.

La modificación con los fragmentos peptídicos de laminina también se cuantificó mediante ensayo de ninhidrina, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla III-11.

Tabla III-11: Densidad de grupos amino por unidad de masa para todas las muestras tratadas con ED, las muestras con los fragmentos peptídicos anclados, y los andamios sin tratar empleados como referencia.

Muestra	Densidad grupos amino ($\mu\text{m NH}_2 \text{ g}^{-1}$)
PHB10.4%HH-a	0.02
PHB10.4%HH-a1	34.33
PHB10.4%HH-a2	45.46
PHB10.4%HH-YIGSR	8.30
PHB10.4%HH-Cis	2.96
PHB10.4%HH-b	0.02
PHB10.4%HH-b1	31.91
PHB10.4%HH-b2	23.49
PHB14%HH-a	0.01
PHB14%HH-a1	23.32
PHB14%HH-a2	39.37
PHB14%HH-YIGSR	8.39
PHB14%HH-b	0.02
PHB14%HH-b1	42.41
PHB14%HH-b2	50.49

Cuando la modificación se realizó con el fragmento peptídico de laminina YIGSR, la funcionalización obtenida, determinada mediante el ensayo de ninhidrina (Tabla III-7), es similar independientemente del tipo de copolímero empleado. Cuando se emplea el fragmento peptídico largo, cadena de cis lamina A, la funcionalización obtenida es inferior a la del otro fragmento, lo que puede indicar la peor interacción con las células de este tipo de andamio, apartado III-3.B.3.

Sin embargo, en todos los casos, los valores de concentración de grupos amino por unidad de peso para las muestras tratadas con los fragmentos peptídicos de laminina, son inferiores que los determinados para las correspondientes muestras funcionalizadas únicamente con ED.

III-3.B.3. ENSAYOS CELULARES

Para evaluar la citotoxicidad de los sustratos, se eligieron muestras características y se realizaron ensayos celulares con células uroteliales cancerígenas tumorales RT112.

Los ensayos se programaron con objeto de evaluar, en primer lugar, la influencia del tipo de copolímero empleado en la obtención de los andamios, y en segundo lugar, la posible variación en el comportamiento atendiendo al fragmento peptídico con el cual se llevó a cabo la modificación superficial.

III-3.B.3.1. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL TIPO DE COPOLÍMERO

Para la evaluación de la influencia del tipo de copolímero en la citotoxicidad de los andamios se escogió un andamio de cada tipo, esto es, un andamio con el copolímero con el 10.4 % de 3HHx y otro con el 14 % de 3HHx, tratados durante 90 s, lo que permitió realizar la unión covalente del fragmento peptídico con seguridad, ya que estos andamios presentan mayor cantidad de funcionalidades amínicas.

Dado que para el andamio PHB10.4%HH-b2 se produjo una disminución de la funcionalización con ED, se escogió el andamio PHB10.4%HH-a2 para el ensayo celular. Este andamio presenta un grado de funcionalización considerado adecuado para la unión covalente y una estabilidad mecánica suficiente para su manejo.

En el caso del copolímero con el 14 % molar de 3HHx, se escogió la muestra PHB14%HH-a2. Esta muestra tiene estabilidad mecánica suficiente, aportando una funcionalización con ED adecuada para la unión covalente del fragmento peptídico. Además, la muestra PHB14%HH-a es la única que presenta estructura tridimensional, ya que para el caso de las muestras PHB14%HH-b no se obtuvo una estructura 3D porosa, tal y como se ha puesto de manifiesto mediante SEM en el presente capítulo (apartado III-3.2.B.1.). 1

La viabilidad celular se determinó a partir de la observación de los andamios mediante microscopía de epifluorescencia, mostrándose las fotografías obtenidas en la Figura III-25.

III-3.B.3.1.1. MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

La elevada fluorescencia de los andamios de P3HB3HHx dificulta enormemente la observación de las imágenes obtenidas. Sin embargo, es posible observar en la Figura III-25 la presencia de células (apreciadas como puntos azules más intensos en las imágenes) en todos los andamios en todos los tiempos de cultivo. Este hecho indica la viabilidad de los andamios funcionalizados con el fragmento peptídico YIGSR, de modo independiente a su composición copolimérica, para la línea celular estudiada (células uroteliales cancerosas humanas RT112).

Una observación detallada de las imágenes parece indicar un incremento del número de células en los andamios a medida que aumenta el tiempo de cultivo, de modo que, a medida que el tiempo de cultivo es superior, se aprecia una mayor concentración de células en los andamios que parecen poblar cada vez más superficie del andamio. Este aumento del número de células y de la superficie cubierta con el tiempo de cultivo que parece verse, podría indicar que se produce un esparcimiento celular sobre los andamios.

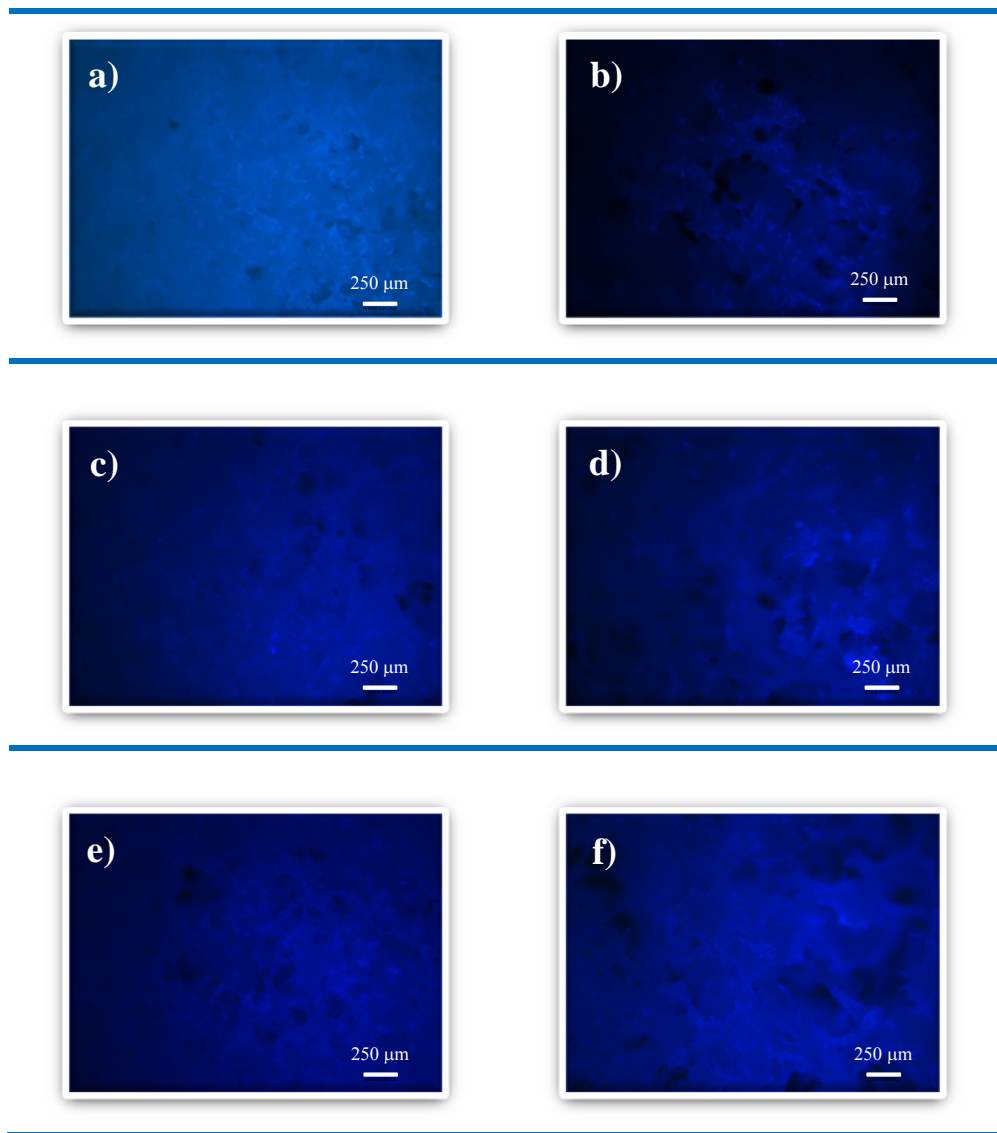


Figura III-25: Imágenes de microscopía de epifluorescencia para PHB10.4%HH-YIGSR después de a) 3 días, c) 5 días y e) 7 días de cultivo y el andamio PHB14%HH-YIGSR después de b) 3 días, d) 5 días y f) 7 días de cultivo. Para ambos andamios se emplearon células uroteliales porcinas RT112.

Estas dos observaciones pueden asociarse con la modificación con el fragmento peptídico YIGSR. Tal y como se ha indicado con anterioridad, se ha determinado que este fragmento peptídico favorece la adhesión, crecimiento y proliferación de células uroteliales.

III-3.B.3.2. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CELULAR EN FUNCIÓN DE LA FUNCIONALIZACIÓN SUPERFICIAL

Aunque ambos tipos de copolímeros presentan compatibilidad celular con las células uroteliales tumorales humanas RT 112, se escogió uno de ellos para realizar el estudio comparativo entre los dos tipos de fragmentos peptídicos bajo estudio, YIGSR y la cadena de cis laminina A. Para la elección del andamio a emplear se atendió a las propiedades mecánicas de los mismos. El andamio PHB10.4%HH-YIGSR presenta un valor de E' más similar al de la vejiga humana⁴⁵ que el PHB14%HH-YIGSR. Se ha determinado que las propiedades mecánicas pueden influir en el crecimiento celular,¹⁹ obteniéndose un mejor crecimiento celular cuanto más parecidas son las propiedades mecánicas del sustrato empleado a las del tejido a sustituir. Por este motivo se eligió el andamio PHB10.4%HH-a2, ya que tras la funcionalización con YIGSR sus propiedades mecánicas son más similares a las de la vejiga humana.

III-3.B.3.2.1. MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

La Figura III-26 se muestra las imágenes de microscopía fluorescente para los andamios PHB10.4%HH-YIGSR, PHB10.4%HH-Cis y el PHB10.4%HH-a empleado como referencia.

Las imágenes muestran que todos los andamios son compatibles con las células empleadas en el estudio tras 4 días de crecimiento celular. Sin embargo, su grado de citocompatibilidad parece variar en función de las características superficiales de los andamios. El andamio que presenta una menor presencia de células en su superficie tras 24 horas de cultivo es PHB10.4%HH-Cis, mientras que en el que parece observarse un mayor número de células es el PHB10.4%HH-YIGSR, indicativo de la mayor viabilidad de este receptor específico para la adhesión celular que fragmentos peptídicos de laminina más largos (cadena A de cis laminina). Es interesante resaltar que el andamio empleado como referencia, PHB10.4%HH-a, también es citocompatible, demostrándose por primera vez la compatibilidad de este copolímero con células RT 112.

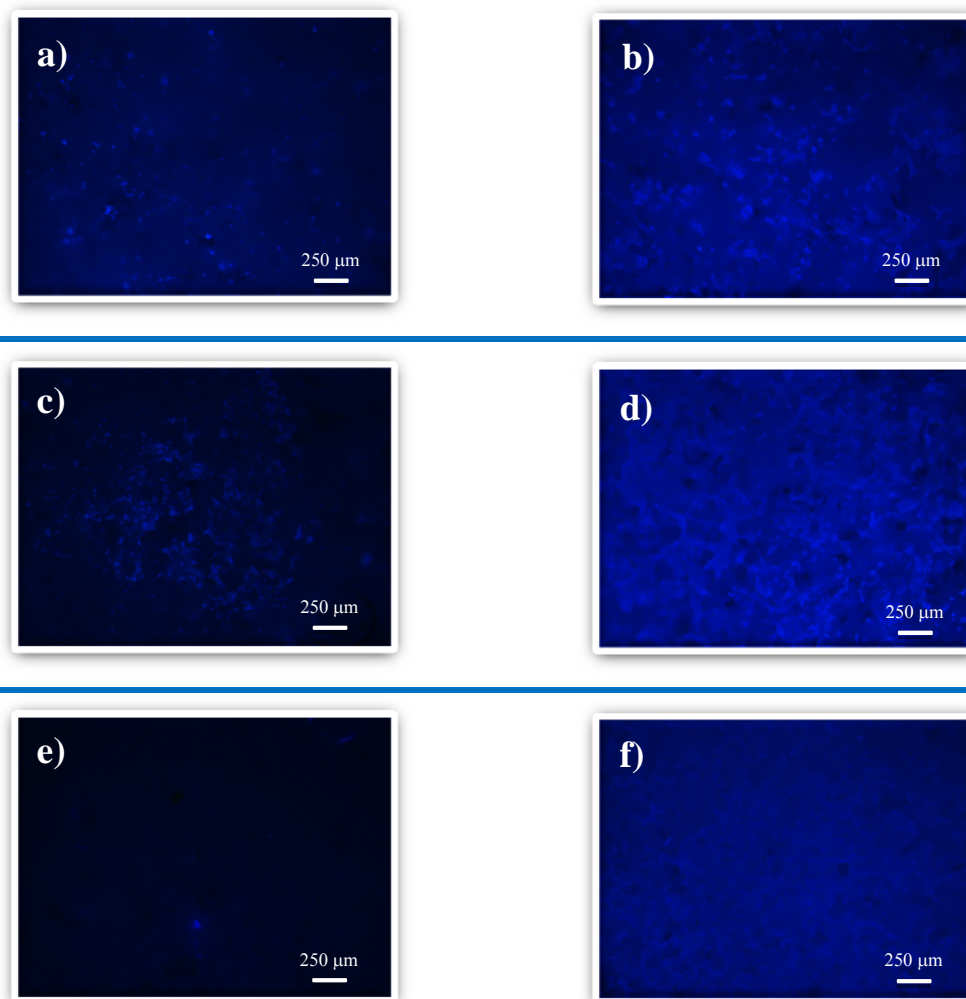


Figura III-26: Imágenes de microscopía de epifluorescencia para el andamio PHB10.4%HH-a después de a) 1 día y b) 4 días, el andamio PHB10.4%HH-YIGSR después de c) 1 día y d) 4 días y el andamio PHB10.4%HH-Cis después de e) 1 día y f) 4 días de cultivo celular con células uroteliales cancerosas humanas RT 112.

Tras 4 días de cultivo todas las muestras presentan una mayor cantidad de células, con especial relevancia de la gran cantidad observada para el andamio PHB10.4%HH-Cis. Este comportamiento podría justificarse si se supone que el fragmento peptídico de la cadena de cis laminina A favorece la proliferación celular, aunque no parece dificultar la adhesión (a la vista de las imágenes tras 1 día de cultivo celular).

El tiempo de cultivo parece favorecer el crecimiento celular en los andamios funcionalizados, que muestran una mayor densidad celular en estas muestras (Figura III-25 d) y f)) que en la empleada como referencia (Figura III-25 b)).

III-3.B.3.2.2. ENSAYO DE MTT

El ensayo MTT aporta información sobre la cantidad de células vivas presentes en los sustratos poliméricos tras el tiempo de cultivo. La Figura III-27 muestra los resultados del ensayo MTT para las tres muestras tras 1 día y 4 días de cultivo.

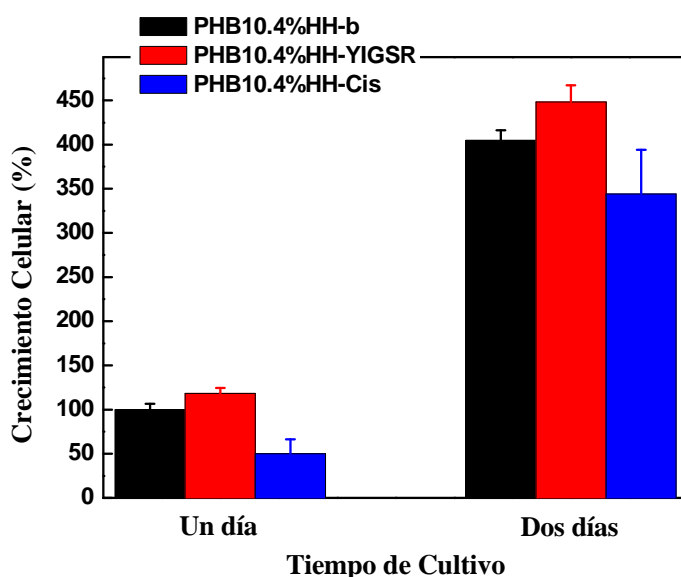


Figura III-27: Ensayo de MTT de los andamios de PHB10.4%HH-a funcionalizados con YIGSR y la cadena de cis lamina A y el PHB10.4%HH-a sin modificar empleado como referencia, tras 1 día y 4 días de cultivo con células uroteliales cancerosas humanas RT 112.

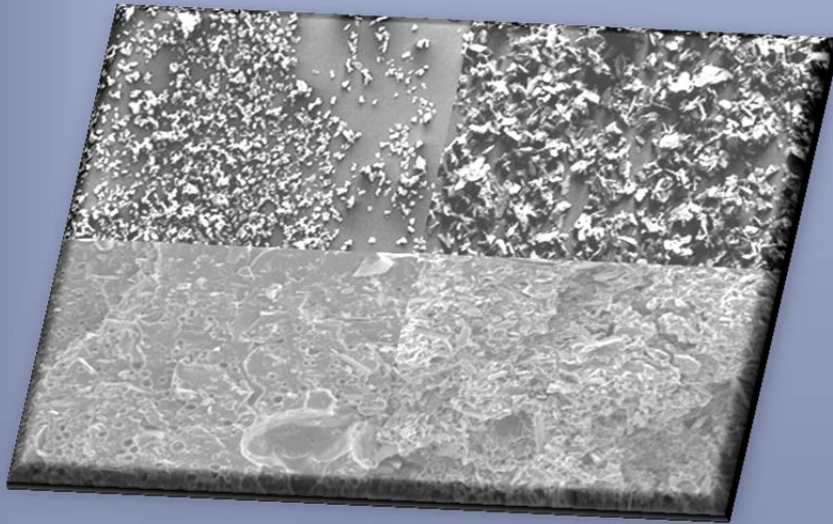
El test de ANOVA de una vía y el test de Turkey ad hoc no indican diferencias significativas entre las muestras para el mismo día de tratamiento. Poner que pasa entre días de tratamiento.

Se puede observar un incremento del 300 % entre el primer y el cuarto día de cultivo en todas las muestras, indicativo de la viabilidad de los sustratos para favorecer la adhesión y proliferación celular. El test de MTT permite determinar que tras 4 días de cultivo las células continúan vivas en todos los sustratos bajo estudio.

III-4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Chen, G. Q.; Wu, Q. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6565.
- (2) Lenz, R. W.; Marchessault, R. H. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1.
- (3) Biddlestone, F.; Harris, A.; Hay, J. N.; Hammond, T. *Polymer International* **1996**, *39*, 221.
- (4) Daly, J. H.; Hayward, D.; Liggat, J. J.; Mackintosh, A. R. *Journal of Materials Science* **2004**, *39*, 925.
- (5) de Koning, G. J. M.; Lemstra, P. J. *Polymer* **1993**, *34*, 4089.
- (6) Hobbs, J. K.; McMaster, T. J.; Miles, M. J.; Barham, P. J. *Polymer* **1996**, *37*, 3241.
- (7) García-García, J. M.; López, L.; París, R.; Núñez-López, M. T.; Quijada-Garrido, I.; De La Peña Zarzuelo, E.; Garrido, L. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2012**, *100 A*, 7.
- (8) Rai, R.; Keshavarz, T.; Roether, J. A.; Boccaccini, A. R.; Roy, I. *Materials Science and Engineering R: Reports* **2011**, *72*, 29.
- (9) Zhao, K.; Deng, Y.; Chen, J. C.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1041.
- (10) Alata, H.; Aoyama, T.; Inoue, Y. *Macromolecules* **2007**, *40*, 4546.
- (11) Doi, Y.; Kitamura, S.; Abe, H. *Macromolecules* **1995**, *28*, 4822.
- (12) Wang, Y. W.; Yang, F.; Wu, Q.; Cheng, Y. C.; Yu, P. H. F.; Chen, J.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2005**, *26*, 755.
- (13) Keen, I.; Broota, P.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Trau, M.; Grøndahl, L. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 427.
- (14) Deng, Y.; Zhao, K.; Zhang, X. F.; Hu, P.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4049.
- (15) Wang, Y.; Bian, Y. Z.; Wu, Q.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2858.
- (16) Hu, Y. J.; Wei, X.; Zhao, W.; Liu, Y. S.; Chen, G. Q. *Acta Biomaterialia* **2009**, *5*, 1115.
- (17) Chun, S. Y.; Lim, G. J.; Kwon, T. G.; Kwak, E. K.; Kim, B. W.; Atala, A.; Yoo, J. J. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4251.
- (18) Holzwarth, J. M.; Ma, P. X. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21*, 10243.
- (19) Baker, S. C.; Rohman, G.; Southgate, J.; Cameron, N. R. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1321.
- (20) Karageorgiou, V.; Kaplan, D. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5474.
- (21) Nazarov, R.; Jin, H. J.; Kaplan, D. L. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 718.
- (22) Nam, Y. S.; Yoon, J. J.; Lee, J. G.; Park, T. G. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1999**, *10*, 1145.
- (23) Mikos, A. G.; Thorsen, A. J.; Czerwonka, L. A.; Bao, Y.; Langer, R.; Winslow, D. N.; Vacanti, J. P. *Polymer* **1994**, *35*, 1068.
- (24) Singh, L.; Kumar, V.; Ratner, B. D. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2611.
- (25) Mooney, D. J.; Baldwin, D. F.; Suh, N. P.; Vacanti, J. P.; Langer, R. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1417.
- (26) Venugopal, J.; Ma, L. L.; Yong, T.; Ramakrishna, S. *Cell Biology International* **2005**, *29*, 861.
- (27) Nam, Y. S.; Park, T. G. *Journal of Biomedical Materials Research* **1999**, *47*, 8.
- (28) Coombes, A. G. A.; Rizzi, S. C.; Williamson, M.; Barralet, J. E.; Downes, S.; Wallace, W. A. *Biomaterials* **2004**, *25*, 315.
- (29) Tay, B. Y.; Zhang, S. X.; Myint, M. H.; Ng, F. L.; Chandrasekaran, M.; Tan, L. K. A. *Journal of Materials Processing Technology* **2007**, *182*, 117.
- (30) Nam, Y. S.; Yoon, J. J.; Park, T. G. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, *53*, 1.
- (31) McGlohorn, J. B.; Holder Jr, W. D.; Grimes, L. W.; Thomas, C. B.; Burg, K. J. L. *Tissue Engineering* **2004**, *10*, 505.
- (32) O'Brien, F. J.; Harley, B. A.; Yannas, I. V.; Gibson, L. *Biomaterials* **2004**, *25*, 1077.
- (33) Ho, M. H.; Kuo, P. Y.; Hsieh, H. J.; Hsien, T. Y.; Hou, L. T.; Lai, J. Y.; Wang, D. M. *Biomaterials* **2004**, *25*, 129.
- (34) Whang, K.; Thomas, C. H.; Healy, K. E.; Nuber, G. *Polymer* **1995**, *36*, 837.

- (35) Whang, K.; Goldstick, T. K.; Healy, K. E. *Biomaterials* **2000**, 21, 2545.
- (36) Kendall, P. A. *Nature* **1963**, 197, 1305.
- (37) Wang, L. Y.; Wang, Y. J.; Cao, D. R. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* **2009**, 46, 765.
- (38) Croll, T. I.; O'Connor, A. J.; Stevens, G. W.; Cooper-White, J. J. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 463.
- (39) Zhu, Y.; Gao, C.; Liu, X.; Shen, J. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1312.
- (40) Gao, Y.; Kong, L.; Zhang, L.; Gong, Y.; Chen, G.; Zhao, N.; Zhang, X. *European Polymer Journal* **2006**, 42, 764.
- (41) Rohman, G.; Pettit, J. J.; Isaure, F.; Cameron, N. R.; Southgate, J. *Biomaterials* **2007**, 28, 2264.
- (42) Massia, S. P.; Rao, S. S.; Hubbell, J. A. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 8053.
- (43) Valeur, E.; Bradley, M. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, 606.
- (44) Niu, X.; Li, X.; Liu, H.; Zhou, G.; Feng, Q.; Cui, F.; Fan, Y. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2012**, 23, 391.
- (45) Dahms, S. E.; Piechota, H. J.; Dahiya, R.; Lue, T. F.; Tanagho, E. A. *British Journal of Urology* **1998**, 82, 411.



IV- BIOCOMPOSITES DE P3HAs PARA REGENERACIÓN ÓSEA

Dos copolímeros distintos del P3HB, P3HB3HV y P3HB3HHx con dos composiciones molares de 3HHx (10.4 % y 14 %), se han empleado como matriz polimérica para la preparación de composites tricomponente. Como relleno se han empleado Bioglass[®] y CaSO₄, dos microcargas ampliamente utilizadas en la ingeniería tisular ósea. Estos nuevos composites representan una primera aproximación a la obtención de un material que cubra parte de las características del tejido multicomponente óseo. Se han evaluado las propiedades químico-físicas de los composites y su capacidad bioactiva *in vitro* mediante inmersión en SBF.

IV-1. INTRODUCCIÓN

IV-1.1. USO DE POLI(HIDROXIALCANOATOS) PARA LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

La aparición de defectos en el tejido óseo producidos por infecciones, cáncer, traumas, cirugía y fracturas está continuamente aumentando con la edad de la población mundial.^{1,2} Bajo determinadas circunstancias desfavorables se producen grandes defectos en los huesos, que no pueden recuperarse por si mismos. Por lo tanto es necesario desarrollar procedimientos de injerto para huesos, con objeto de proporcionar soporte mecánico y/o estructural al hueso dañado. En el campo de la regeneración de tejido duro se han empleado una serie de combinaciones de polímeros biodegradables y materiales cerámicos en forma de materiales bicompatibles para sustitución de hueso y andamios para tejido óseo.³⁻⁶

Los poli(hidroxicanoatos) es una familia de poliésteres alifáticos que son producidos por varios tipos de microorganismos, bajo determinadas condiciones de crecimiento desequilibrados, con variaciones en el aporte de nutrientes al medio de crecimiento.^{5,7} Son materiales muy prometedores para aplicaciones biomédicas debido a su origen natural, probada biocompatibilidad y bioabsorbibilidad modulable. Uno de los miembros más destacados, y el más ampliamente estudiado, de la familia de los P3HAs es el poli(3-hidroxitirato). Doyle y colaboradores⁷ han demostrado que materiales basados en PHB producen la regeneración de tejido óseo sin evidencias de inflamación crónica no deseada después de la implantación hasta periodos de 12 meses. El P3HB y sus copolímeros con ácido hidroxivalérico, poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxivalerato), se han estudiado con profusión como biomateriales en el marco de estudios *in vitro* e *in vivo*.⁸⁻¹⁰ Sin embargo, tanto el P3HB como el P3HB3HV son frágiles o sufren cristalización secundaria, lo que puede proporcionar un comportamiento mecánico indeseado para algunas aplicaciones. Esto podría restringir sus potenciales aplicaciones *in vivo*.¹¹ Poliésteres al azar de P3HB con 3-hidroxihexanoato, poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxihexanoato), son miembros recientes de la familia de los P3HAs, y presentan propiedades mecánicas mejoradas.^{5,12} Las aplicaciones biomédicas del P3HB3HHx también han sido objeto de estudio.¹³ Unido a esta mejora de las propiedades mecánicas, se ha determinado que el P3HB3HHx mejora el crecimiento de fibroblastos y osteoblastos con respecto al PLA y el P3HB.^{12,14}

IV-1.2. VIDRIOS BIOACTIVOS Y SU USO EN TERAPIAS REGENERATIVAS DEL TEJIDO ÓSEO

De un modo general, un material bioactivo se define como un material que se ha diseñado para inducir una actividad biológica específica.¹⁵ En un sentido más estricto, un material bioactivo en reconstrucción ósea se puede definir como un material que sufre reacciones superficiales específicas cuando se implanta en el organismo, dando lugar a la formación de capas con estructura de hidroxiapatita (HA), que es la responsable de la formación de enlaces estables con los tejidos blandos y duros.¹⁶ La habilidad de un material para formar una capa de HA en su superficie cuando se introduce en fluido corporal simulado (SBF, del inglés Simulated Body Fluid) *in vitro*, suele considerarse como indicativo de su bioactividad *in vivo* para regeneración de tejido óseo.^{17,18}

Vidrios bioactivos de silicatos, boratos y fosfatos se emplean en la regeneración de tejido óseo, siendo los más ampliamente empleados y estudiados los silicatos, cuyo representante más característico para aplicaciones biomédicas es el Bioglass[®] (tipo 45S5).¹⁹ Este vidrio está basado en la formación de una red 3D de SiO₂ en el que el Si está tetraordinado con el O. Las características claves que son responsables de la bioactividad del Bioglass[®] son su bajo contenido en SiO₂ (45.0 %) (de modo comparativo con vidrios de silicato más estables químicamente), su alto contenido en Na₂O (24.5 %) y CaO (24.5 %) (que actúan como deformadores de la estructura vítrea) y la elevada relación CaO/P₂O₅ (6.0 % de P₂O₅).²⁰

El Bioglass[®] (tipo 45S5) es el miembro más antiguo de la familia de los vidrios bioactivos que proporciona una respuesta fisiológica específica, incluyendo la formación de sílice superficial reactiva, que da lugar a la deposición de una fina capa de carbonato de hidroxiapatita en la superficie del vidrio cuando se implanta o está en contacto con fluidos biológicos *in vitro* o *in vivo*.¹⁹ Dado que esta capa de HA es similar al constituyente mineral del hueso, esta capa se une de modo firme con el hueso vivo y los tejidos. A pesar de que ciertos detalles de los cambios estructurales y químicos que se producen todavía son desconocidos, se cree que la capa de HA se forma como consecuencia de una serie de reacciones sucesivas sobre la superficie del Bioglass[®] implantado en el organismo (Figura IV-1) y que ha sido descrito por Hench.¹⁹

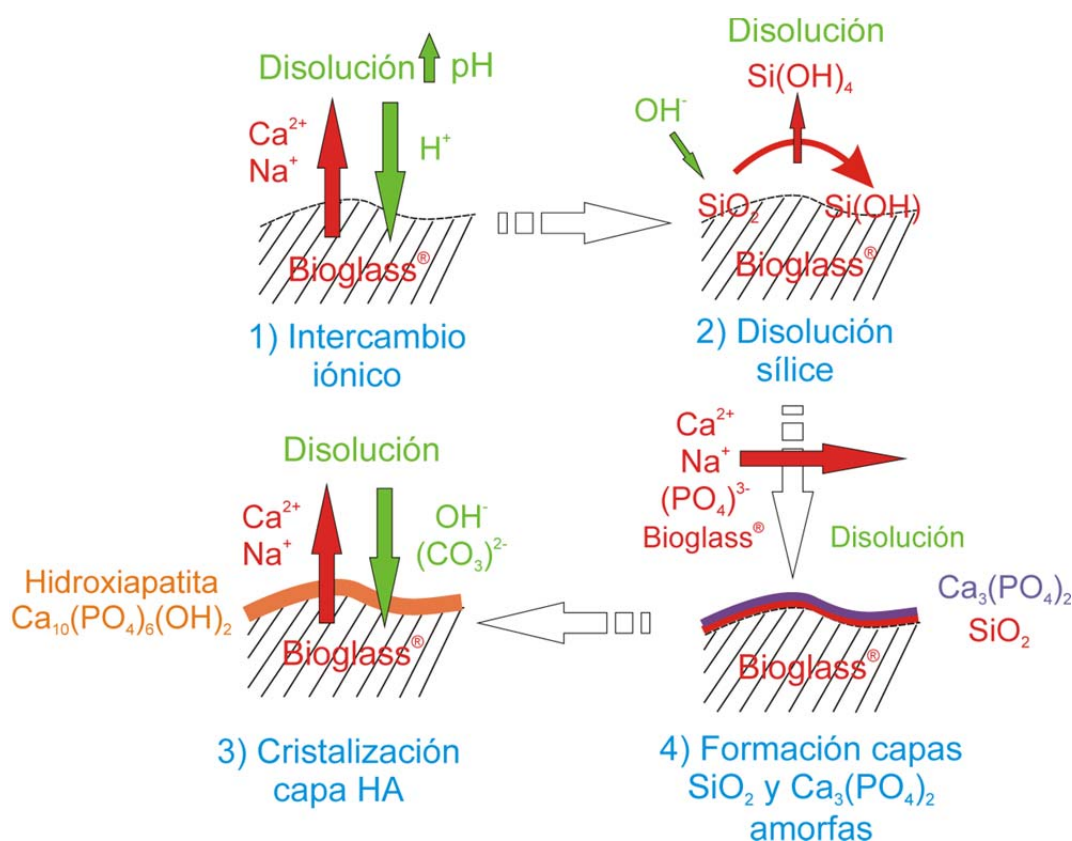


Figura IV-1: Esquema representativo de la formación de hidroxiapatita sobre la superficie del Bioglass® después de su implantación en el organismo.

En una primera fase se producen rápidas reacciones de intercambio iónico entre los modificadores de la estructura del vidrio, esto es el Ca^{2+} y el Na^+ , con iones H^+ de la disolución, produciéndose la hidrólisis de los silicatos y la reacción de los grupos silanol (Si-OH) en la superficie del Bioglass®. Como consecuencia de la reacción con los protones el pH de la disolución aumenta produciendo, en una segunda etapa, la disolución de la sílice por reacción del SiO_2 con los iones OH^- , dando lugar a ácido silícico (Si(OH)_4). La disolución de la sílice produce la formación del hidróxido de silicio sobre la superficie del biovidrio. A pesar de que la disolución del Bioglass® es lenta se ha determinado que su disolución aumenta cuanto mayor es la cantidad de SiO_2 presente en su composición.²¹

Esta disolución da lugar a una tercera etapa, en la que se produce la condensación de una capa amorfa de SiO_2 a medida que el vidrio se empobrece en iones Na^+ y Ca^{2+} . La disolución continúa del vidrio se une a la migración de iones $(\text{PO}_4)^{3-}$.

hacia la disolución dando lugar a la formación de una capa amorfa de fosfato cálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sobre la capa de SiO_2 amorfa previamente condensada sobre el Bioglass[®]. En la última etapa se produce la incorporación de iones OH^- y $(\text{CO}_3)^{2-}$ desde la disolución y se cristaliza una capa de HA, mientras continúa la disolución del biovidrio.

Con esta capa inicial de HA se cree que el mecanismo biológico de formación de enlaces con el hueso incluye la absorción de factores de crecimiento, seguido de la unión, proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras.² Los Osteoblastos (células formadoras de hueso) dan lugar a una matriz extracelular (colágeno), que se mineraliza para formar nanocristales minerales y colágeno sobre la superficie del implante de Bioglass[®], mientras que la degradación y la conversión en HA del biovidrio continúa a lo largo del tiempo.²²

De este modo, los vidrios bioactivos tienen la habilidad de formar estructuras de apatita similares a la del hueso y permitir la formación de enlaces mecánicamente estables con el hueso.²³ También se ha determinado que los vidrios bioactivos proporcionan un entorno ideal para la colonización y proliferación celular de osteoblastos.²⁴ El Bioglass[®], siendo un material bioactivo, biocompatible, osteoconductor, no tóxico y no inflamatorio, así como siendo un agente no inmunogénico, puede ser usado en reconstrucción maxilofacial, aplicaciones dentales, en recubrimiento para prótesis ortopédicas y como relleno para los defectos óseos y composites con biopolímeros, como por ejemplo para andamios de tejido óseo.^{3,8,19,23-28}

IV-1.2. SULFATOS DE CALCIO EN LA INGENIERÍA TISULAR ÓSEA

El primer material empleado en las estrategias de sustitución de huesos fue el sulfato de calcio (CaSO_4). Estos materiales se han usado de modo satisfactorio en aplicaciones clínicas y han sido usados para la reparación de una gran variedad de defectos en distintos huesos.²⁹ La primera reseña de su uso como material de injerto en el tejido óseo se remonta a 1892, cuando Dressman trató defectos largos en huesos utilizando el CaSO_4 como sustituto óseo y material de relleno. Estos prometedores resultados iniciales fueron confirmados a lo largo del siglo XX por investigadores como Nielson en 1944,³⁰ o Peltier y Lillo en 1955,³¹ entre otros.

Además de su labor como relleno, Walsh et al.³² observaron un aumento de las concentraciones de la proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2), de BMP-7, factor de

crecimiento transformante-beta (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en defectos femorales rellenos con CaSO_4 . El aumento de la concentración de estos factores se ha asociado a la reducción de pH producida por la degradación del CaSO_4 implantado, lo que origina la desmineralización de las paredes del implante, dando lugar a la secreción de los mencionados factores. Los nuevos factores generados desempeñan un papel activo en la regeneración del tejido conjuntivo, lo que es indicativo de que el sulfato de calcio puede tener un factor activo en el proceso de osteogénesis. Además, otros estudios han demostrado que el CaSO_4 es biocompatible, biodegradable, osteoconductor, seguro y no tóxico,³²⁻³⁴ afianzando su viabilidad como material para regeneración de tejido óseo. Además, los sulfatos de calcio se reabsorben rápidamente *in vivo* sin provocar una respuesta inflamatoria significativa. Estudios dentales y ortopédicos indican que la reabsorción del CaSO_4 es rápida y completa en comparación con otros materiales empleados para la regeneración ósea.^{31,34}

A pesar de que posee excelentes cualidades para su uso en terapias regenerativas del tejido óseo, el CaSO_4 no puede proporcionar sustratos tridimensionales a largo plazo que mantengan sus propiedades osteoconductoras.³⁵ Con todo ello, los principales usos del CaSO_4 han sido como relleno para huecos óseos y portador osteoconductor para antibióticos o moléculas bioactivas,^{1,36,37} haciéndose necesario el uso de un sustrato estable mecánicamente para un empleo adecuado del CaSO_4 como implante en el organismo.

Considerando que el tejido óseo es una estructura compuesta orgánica-inorgánica, materiales de una sola fase no son suficientes para proporcionar todas las propiedades biológicas y mecánicas necesarias para llevar a cabo un injerto satisfactorio en los huesos. Por ello, la combinación de polímeros y materiales biocerámicos con diferentes propiedades en forma de composites puede cubrir todas estas demandas.³⁻⁶ En este estudio se han preparado composites orgánicos-inorgánicos de tres fases, compuestos por Bioglass[®], sulfato de calcio dihidratado y dos copolímeros diferentes de P3HAs. Los copolímeros de P3HAs empleados han sido P3HB3HV, con 12 % molar de 3HV, y P3HB3HHx, con 10.4 % y 14 % molar de 3HHx, fabricándose los composites con composiciones variables de Bioglass[®] y sulfato de calcio, de 0, 18.2, 31.6, 37.1 y 46.2 % (v/v).

En este capítulo se examinan las propiedades mecánicas, térmicas y superficiales de los nuevos composites obtenidos, y la influencia de los dos rellenos en sus propiedades, con énfasis en el diferente comportamiento en función de los P3HAs empleados y de su composición copolimérica. Además, se estudió la bioactividad acelular de los biocomposites mediante la inmersión en fluido corporal simulado y la formación de hidroxiapatita en la superficie de los materiales se determinó mediante espectroscopia Raman.

IV-2. MATERIALES Y MÉTODOS

IV-2.1. MATERIALES

Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)(P3HB3HV)

El poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) comercial, con un 12 % molar de 3-hidroxivalerato ($\bar{M}_w = 230000 \text{ g mol}^{-1}$) se adquirió a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)(P3HB3HHx)

Los dos copolímeros de origen natural de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato), con 10.4 % ($\bar{M}_w = 132000 \text{ g mol}^{-1}$) y 14 % ($\bar{M}_w = 102000 \text{ g mol}^{-1}$) molar de 3-hidroxihexanoato, fue proporcionado por el Profesor Chen Guo Qiang de la Universidad de Tsinghua, China.

Reactivos

El vidrio bioactivo Bioglass[®] (tipo 45S5), empleado en la preparación de los composites fue suministrado en forma de polvo, con un tamaño medio de partícula de 16 μm , por el Dr I. Thompson del King's College, Londres, Reino Unido. El sulfato de calcio dihidrato ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), igualmente empleado en la preparación de los composites, se compró a VWR (Darmstadt, Alemania). El tamaño medio de este polvo es de 18 μm . Los dos materiales empleados como carga en la obtención de los composites se emplearon sin purificación previa.

Los reactivos NaCl, NaHCO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HCl (32 % v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y el Na_2SO_4 , para la preparación del fluido corporal simulado se

adquirieron a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El KCl, también utilizado en la preparación SBF, fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

Disolventes

El CHCl_3 empleado para la purificación y disolución de los polímeros fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), empleándose sin purificación previa.

IV-2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Preparación de Composites Tricomponente (Polímero, Bioglass® y CaSO_4)

Los composites se prepararon mediante el método de colada. También se prepararon películas de los polímeros para usarlas como referencia de modo comparativo con los composites. La metodología empleada es la descrita a continuación y esquematizada en la Figura IV-2.

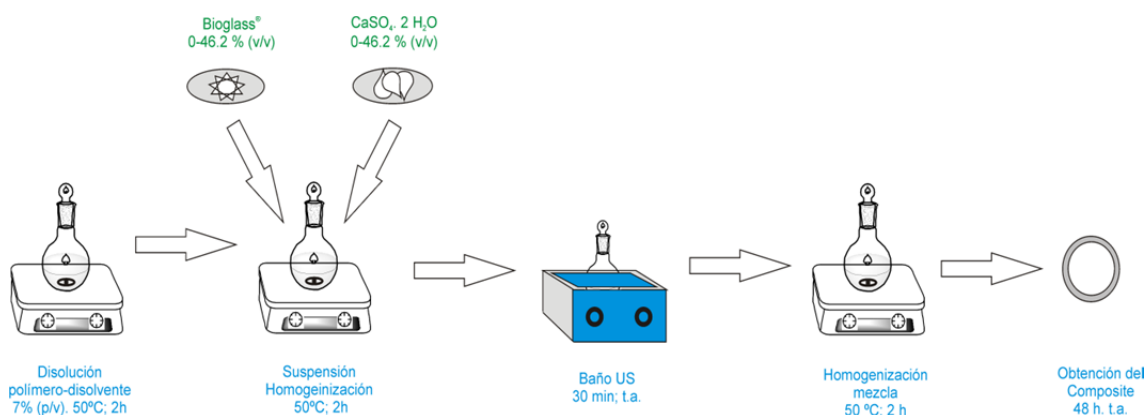


Figura IV-2: Esquema general del proceso de obtención de biocomposites tricomponente mediante el método de colada.

Los diferentes polímeros se disolvieron en 10 mL de cloroformo, manteniendo un relación peso polímero-disolvente del 7 % (p/v). Esta relación se determinó mediante estudios preliminares a fin de conseguir una buena disolución del polímero y obtener la completa evaporación del disolvente y controlar la velocidad durante el proceso de secado. La disolución se agitó magnéticamente durante 2 h, a 50 °C, para garantizar la disolución completa del polímero.

Después de la disolución del polímero se añadieron las cargas, Bioglass[®] y CaSO₄, a la disolución, y se mantuvo la agitación durante otras 2 h a temperatura constante durante todo el proceso (50 °C). Para romper los aglomerados de las microcargas añadidas se aplicaron ultrasonidos a la disolución durante 30 minutos, haciendo uso de un baño de ultrasonidos. La aplicación de ultrasonidos (US) rompe los aglomerados, con objeto de permitir una mayor interacción entre polímero y partículas. Después de la aplicación de ultrasonidos la disolución se agitó durante 2 h a 50 °C.

Finalizado el proceso de homogeneización de la mezcla, la disolución se vertió sobre un molde circular de aluminio (diámetro 50 mm) empleando una pipeta Pasteur. Para controlar la evaporación del disolvente, los moldes se cubrieron y mantuvieron a temperatura ambiente durante 48 h en campana de extracción de gases. Las muestras se almacenaron en un desecador hasta su uso.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, del inglés Differential Scanning Calorimetry)

La influencia de los distintos componentes y sus concentraciones en las propiedades térmicas de los composites se evaluaron mediante calorimetría diferencial de barrido. Como variables de estudio se emplearon la temperatura de transición vítrea (T_g), las temperaturas de fusión (T_m) y las entalpías de fusión (ΔH_m) a partir de las endotermas de fusión. Muestras de 8-12 mg se escanearon desde -30 °C hasta 180 °C bajo un flujo de nitrógeno de 40 mL min⁻¹ a una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 10 °C min⁻¹. Se analizaron dos muestras de cada tipo para asegurar la reproducibilidad de la medida, empleando un equipo DSC 2920, de TA instruments. Dada la alta hidrofiliadad de algunos de los componentes de los composites, las muestras se mantuvieron a vacío durante 48 h a 80 °C, a fin de evitar al máximo la absorción de humedad.

A partir de los termogramas obtenidos, la T_g se estimó como la temperatura donde la capacidad calorífica es intermedia entre los valores correspondientes al estado vítreo y al estado gomoso. Las temperaturas de fusión se estimaron a partir de los valores máximos de flujo de calor del primer barrido y las correspondientes ΔH_m se determinaron como el área bajo la curva de los picos de fusión correspondientes.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, del inglés Scanning Electron Microscopy)

La microscopía electrónica de barrido representa una técnica fácilmente accesible para el estudio de la interacción de las cargas con la matriz polimérica y su distribución, en el caso de la obtención de composites. Por ello, mediante el uso de un equipo LEO 435VP (Zeiss-Leica, Cambridge, England), se estudió la morfología de los composites.

Para la observación de la interacción de las distintas cargas con la matriz polimérica se observó una sección transversal de todos los composites preparados, fracturando las muestras tras introducirlas en N₂ líquido durante 10 minutos. Tras el recubrimiento con Platino del corte transversal se tomaron fotografías de todas las muestras a distintos aumentos, trabajando a 10 kV y una distancia de trabajo de 11 mm, en condiciones de vacío (10^{-5} mbar).

En función de la cantidad y tipo de carga añadida a una matriz polimérica, así como de la interacción con ella, es posible que se produzca la migración del relleno hacia las superficies de los composites. Este efecto se estudió mediante la observación de las superficies de los composites PHBHV-2, PHB10.4%HH-2 y PHB14%HH-2. Estos composites presentan la composición intermedia de las preparadas y se emplearon como modelo para el estudio de la migración de las microcargas en la matriz polimérica, empleando una película de los polímeros sin carga como referencia. La observación superficial se realizó en las mismas condiciones que la de las secciones transversales tras el recubrimiento pertinente de las superficies con Platino.

Análisis Termo Mecanodinámico (DMTA, del inglés Dynamic Mechanical Thermal Analysis)

Mediante los experimentos de análisis termo mecanodinámico se midió la dependencia con la temperatura del módulo de almacenamiento (E') y del módulo de pérdida (E'') de los composites. Para ello, muestras de 5 mm de anchura y espesores entre 250 y 600 μm se analizaron en un equipo Rheometric Scientific Dynamic Mechanical Thermal Analyzer (DMTA IV). Las muestras se analizaron desde -50 °C hasta 120 °C (P3HB3HV) o 75 °C (P3HB3HHx) a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, empleando la frecuencia de 1 Hz. La temperatura máxima de medida se escogió en función de la temperatura de

fusión de los polímeros. Como consecuencia de su mínima estabilidad mecánica, las muestras con la mayor cantidad de ambas cargas (37.1 % de Bioglass[®] y 37.1 % de CaSO₄), PHBHV-c, PHB10.4%HH-c y PHB14%HH-c, no se pudieron medir por DMTA debido a su fragilidad.

Ensayos de Esfuerzo-Deformación

La metodología empleada para la medida de las propiedades mecánicas mediante ensayo de esfuerzo-deformación es similar a la descrita en la sección “*Ensayos de Esfuerzo-Deformación*” del Capítulo III. Los ensayos se realizaron en un equipo Zwick Z050 equipado con una célula de carga de 1 kN. Se midieron tres especímenes de cada muestra (ancho: 5 mm; longitud: 33 mm; espesor: ~ 70-400 μm) a temperatura ambiente con una precarga de 0.3 N a una velocidad de 1 mm min⁻¹. Los resultados se presentan como la media de las tres medidas realizadas \pm la desviación estándar.

Medidas de Ángulo de Contacto (CA, del inglés Contact Angle)

A fin de evaluar la humecatabilidad de la superficie de los composites se midió el ángulo de contacto de varias muestras empleadas como referencia, siguiendo el procedimiento descrito en “*Medidas de Ángulo de Contacto (CA, del inglés Contact Angle)*”, (subapartado II.2.2.5., Capítulo II). El equipo empleado fue un sistema de medición de ángulo de contacto OCA (data physics, Filderstadt, Alemania). Las medidas se realizaron en atmósfera de aire a temperatura ambiente, dándose los resultados como la media de cuatro medidas \pm la desviación estándar.

Estudios de Bioactividad in vitro en Fluido Corporal Simulado (SBF, del inglés Simulate Body Fluid)

Los estudios de bioactividad *in vitro* (acelular) se realizaron usando SBF estándar según la formulación desarrollada por Kobuko et al.¹⁶ La solución de SBF se preparó disolviendo las cantidades adecuadas de las sales necesarias: NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄·3H₂O, MgCl₂·6H₂O, HCl 1 N, CaCl₂·2H₂O y Na₂SO₄. El pH de la disolución se ajustó al pH fisiológico (pH 7.4) empleando una disolución de HCl y se tamponó con tri(hidroximetil)amino metano [NH₂C(CH₂OH)₃].

Se introdujeron muestras de cada composite de 1 cm² en 50 mL de SBF en botellas estériles de PE, colocándolas en un incubador a 37 °C bajo agitación suave. La

disolución de SBF se cambió cada 7 días sin observarse cambios en el pH durante este periodo de tiempo. Después de 3, 7, 14, 21 y 28 días se sacaron las muestras de la disolución de SBF y se lavaron cuidadosamente con abundante agua desionizada para eliminar el exceso de sales que pudieran acumularse en la superficie de los composites. Previo a su utilización, las muestras se secaron en un horno a 60 °C durante 48 h, para asegurar el completo secado de los constituyentes de los biocomposites, microcargas y polímeros. Para llevar a cabo el estudio de la bioactividad se midió la formación de cristales de HA en la superficie de los composites empleando la metodología usual en el campo de los biomateriales para la ingeniería de tejido óseo.^{3,19,23,26,27}

Espectroscopia Raman

Se realizaron medidas mediante espectroscopia Raman de todas las muestras antes y después del estudio de viabilidad *in vitro* con SBF. El espectrómetro empleado fue un LabRAM HR (Horriba Jobin Yvon Ltd, Reino Unido) con una cámara CCD como detector y el programa LABSPACE para el análisis de los datos. Se empleó una longitud de onda de excitación de 633 nm de un láser de He-Ne. Se midieron tres espectros de cada muestra en distintos puntos en el rango 3200-300 cm⁻¹, con un agujero de 1000 mm, una hendidura de 100 mm, rejilla a 1800, con un objetivo en el microscopio de 50X, con un tiempo de exposición de 4 s y de 3 s de acumulación.

IV-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV-3.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

La composición de los composites se varió mediante la adición de distintas cantidades de microcargas. A fin de estudiar el efecto individualizado de las distintas cargas en la matriz polimérica, también se prepararon composites bicomponentes, con la matriz polimérica y cada una de las cargas por separado. Todos estos composites se compararon con películas de los polímeros empleadas como referencia. Todas las composiciones realizadas, así como la nomenclatura de las muestras preparadas y estudiadas durante el presente capítulo se presentan en la Tabla IV-1.

Tabla IV-1: Composición de los biocomposites preparados mediante el método de colada.

Muestra	Polímero	Polímero (%) (v/v)	Bioglass [®] (%) (v/v)	CaSO ₄ ·2H ₂ O (%) (v/v)
PHBHV		100	0	0
PHBHV-1		53.8	46.2	0
PHBHV-2	PHBHV (12 % HV)	53.8	0	46.2
PHBHV-a		63.6	18.2	18.2
PHBHV-b		36.8	31.6	31.6
PHBHV-c		25.9	37.1	37.1
PHB10.4 %HH		100	0	0
PHB10.4 %HH-1	P3HB3HHx (10.4 % HHx)	53.8	46.2	0
PHB10.4 %HH-2		53.8	0	46.2
PHB10.4 %HH-a		63.6	18.2	18.2
PHB10.4 %HH-b		36.8	31.6	31.6
PHB10.4 %HH-c		25.9	37.1	37.1
PHB14 %HH		100	0	0
PHB14 %HH-1	P3HB3HHx (14 % HHx)	53.8	46.2	0
PHB14 %HH-2		53.8	0	46.2
PHB14 %HH-a		63.6	18.2	18.2
PHB14 %HH-b		36.8	31.6	31.6
PHB14 %HH-c		25.9	37.1	37.1

IV-3.2. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES TÉRMICAS DE LOS BIOCOMPOSITES MEDIANTE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

La influencia del Bioglass[®] y el CaSO₄ en las propiedades térmicas de las diferentes matrices de PHAs se estudió mediante DSC. La Tabla IV-2 muestra las

distintas variables térmicas obtenidas a partir del primer ciclo de calentamiento de los composites y las películas de PHAs empleadas como referencia.

Tabla IV-2: Propiedades térmicas de las películas de PHAs y sus composites con Bioglass® y CaSO₄, determinadas mediante DSC.

Muestra	ΔH_{1-2} (J g ⁻¹)	X _c (%)	T _g (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T ₃ (°C)	T ₄ (°C)	ΔH_{3-4} (J g ⁻¹) ($\Delta H_3/\Delta H_4$)
PHBHV	71.2	64.7 ^a	-	141.8	155.5	-	-	-
PHBHV-a	79.0	-	-	140.2	153.7	-	-	-
PHBHV-b	72.0	-	-	141.0	153.4	-	-	-
PHBHV-c	67.1	-	-	134.3	150.3	-	-	-
PHB10.4%HH	35.5	34.0 ^b	-1.8	90.7	99.9	-	-	-
PHB10.4%HH-a	9.3	8.9 ^d	-4.7	89.7	98.0	139.0	157.0	319.7 (1.5)
PHB10.4%HH-b	22.2	21.2 ^d	-2.0	83.8	99.3	145.1	157.9	515.5 (7.2)
PHB10.4%HH-c	-	-	-	-	-	148.5	158.7	630.7 (14.5)
PHB14%HH	34.4	26.0 ^c	-3.2	89.7	100.8	-	-	-
PHB14%HH-1	35.0	26.5 ^e	-3.1	87.7	98.1	-	-	-
PHB14%HH-2	25.7	19.5 ^e	-2.4	87.2	99.5	-	153.3	432.1
PHB14%HH-a	33.2	25.1 ^c	-3.0	89.9	96.6	105.9	-	14.5
PHB14%HH-b	26.6	20.1 ^c	-2.7	83.9	100.4	141.6	Shoulder	339.3
PHB14%HH-c	23.2	17.5 ^e	-5.1	90.2	100.0	-	154.5	550.4

^a El grado de cristalinidad, X_c (%), del polímero se estimó usando la siguiente ecuación:

$$X_c (\%) = (H_f/H_{100\%}) \times 100$$

Donde H_f es la entalpía aparente de fusión de la matriz polimérica y H_{100%} es la entalpía de fusión del PHBHV (12 % molar de HV) teóricamente 100 % cristalino (110 J g⁻¹).³⁸

^b Valor de cristalinidad determinado mediante difracción de Rayos-X y empleada aquí como referencia.³⁹

^c Valor de cristalinidad determinado mediante difracción de Rayos-X y empleada aquí como referencia.³⁹

^{d,e} El grado de cristalinidad, X_c (%), de la matriz polimérica en los biocomposites se determinó usando la siguiente ecuación:

$$X_c (\%) = (H_f/H_{ref}) \times X_{c,ref} (\%)$$

Donde H_f es la entalpía de fusión aparente de la matriz polimérica, H_{ref} es la entalpía de fusión de la película obtenida a partir del correspondiente copolímero y X_{c,ref} (%) es el grado de cristalinidad del polímero determinado mediante difracción de Rayos-X y empleado aquí como referencia, ^d34.0 % y ^e26.0 % para PHB10.4%HH and PHB14%HH, respectivamente.

Para las películas de polímeros, los valores de la T_g y las T_m están en concordancia con los valores observados en la literatura.^{40,41} La Figura IV-3 muestra los termogramas típicos de los composites basados en el copolímero con el 14 % de HHx con Bioglass® (PHB14%HH-1) o CaSO₄ (PHB14%HH-2). Estas muestras se emplean como referencia en este estudio para intentar explicar el efecto de cada uno de las microcargas en el comportamiento térmico de los composites por separado.

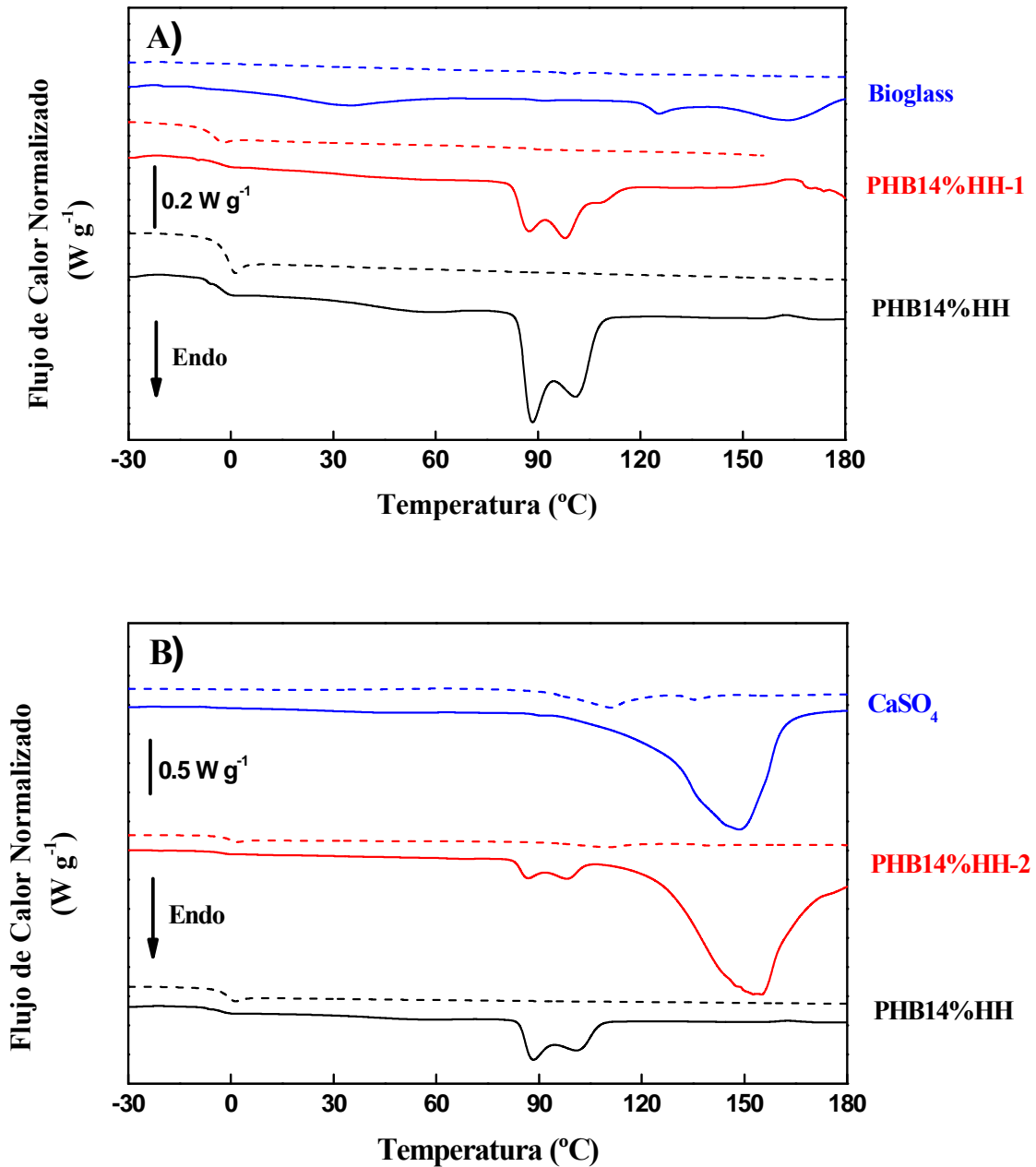


Figura IV-3: Termogramas normalizados de DSC del primer (—) y segundo barrido (-----) de A) PHB14%HH, PHB14%HH-1 y Bioglass[®] y B) PHB14%HH, PHB14%HH-2 y CaSO_4 . Las unidades en el eje y son arbitrarias, y las curvas se han desplazado en este eje por claridad.

Tal y como se observa en la Figura IV-3, en el rango de temperaturas estudiado, el Bioglass[®] presenta 4 picos endotérmicos a 33.7 $^{\circ}\text{C}$, 92.0 $^{\circ}\text{C}$, 125.6 $^{\circ}\text{C}$ y 163.7 $^{\circ}\text{C}$ (Figura IV-3, A), mientras que el CaSO_4 presenta sólo un gran pico endotérmico a 148.6 $^{\circ}\text{C}$ (Figura IV-3, B) correspondiente a su proceso de deshidratación ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4$).⁴² Las curvas de DSC de las películas de PHB14%HH

presentan dos picos endotérmicos, ajustándose al comportamiento usualmente observado para este copolímero.⁴³ En el caso de los composites de P3HB3HHx, tal y como se puede observar en la Figura IV-3 A y la Tabla IV-2, las transiciones correspondientes al Bioglass[®] no se observan de modo general en las mezclas. Solamente se observó la presencia de un pequeño hombro en torno a 115 °C en el termograma de PHB14%HH-1 (Figura IV-3, A), que podría atribuirse a la influencia del Bioglass[®] en la matriz de polímero con el desplazamiento del pico endotérmico determinado para el Bioglass[®] a 125.6 °C. Tal y como se detalla a continuación, no se pudo medir la influencia del Bioglass[®] en el comportamiento térmico cuando se emplearon ambas cargas.

Observando los termogramas correspondientes al segundo barrido (Figuras IV-3 y IV-5), las endotermas de fusión de los copolímeros con 14% molar de HHx no se detectaron. Este comportamiento también se ha observado para los copolímeros PHB10.4%HH (Figura IV-4) y PHBHV (Figura IV-6), siendo este comportamiento el normalmente observado para los copolímeros de P3HB3HHx en la literatura.⁴⁴ Sin embargo, para el caso del copolímero PHBHV este comportamiento difiere del de las películas sin carga, y puede atribuirse a la disminución de la velocidad de cristalización de los polímeros durante el enfriamiento (después del primer calentamiento) como consecuencia de la incorporación de las microcargas, habiendo sido observado este comportamiento con anterioridad para el PHB.⁴⁵

El análisis de los resultados correspondientes a los copolímeros de hexanoato recogidos en la Tabla IV-2 y representados en las Figuras IV-4 y IV-5, muestra de modo general, una reducción en las temperaturas y entalpía de fusión de los polímeros cuando se aumenta la cantidad de carga añadida. Este resultado puede atribuirse de modo mayoritario a la presencia del sulfato de calcio, ya que este comportamiento no se observó en la muestra que contenía sólo Bioglass[®] (PHB14%HH-1) (Figura IV-3, A)). Puesto que el proceso de obtención de los composites sólo incluye la disolución de los polímeros sin tratamiento químico alguno, es muy improbable que se haya producido un cambio molecular o en el peso de los copolímeros, lo que permite atribuir la disminución de las temperaturas y entalpías de fusión a una disminución en el proceso de cristalización. Esta reducción de la cristalización se produce como consecuencia de la disminución en la movilidad de las cadenas poliméricas, lo que favorece la

cristalización primaria e inhibe la cristalización secundaria, dando como resultado la formación de cristales de menor tamaño, cristales que presentan menores temperaturas y entalpías de fusión, tal y como se ha medido mediante calorimetría diferencial de barrido.

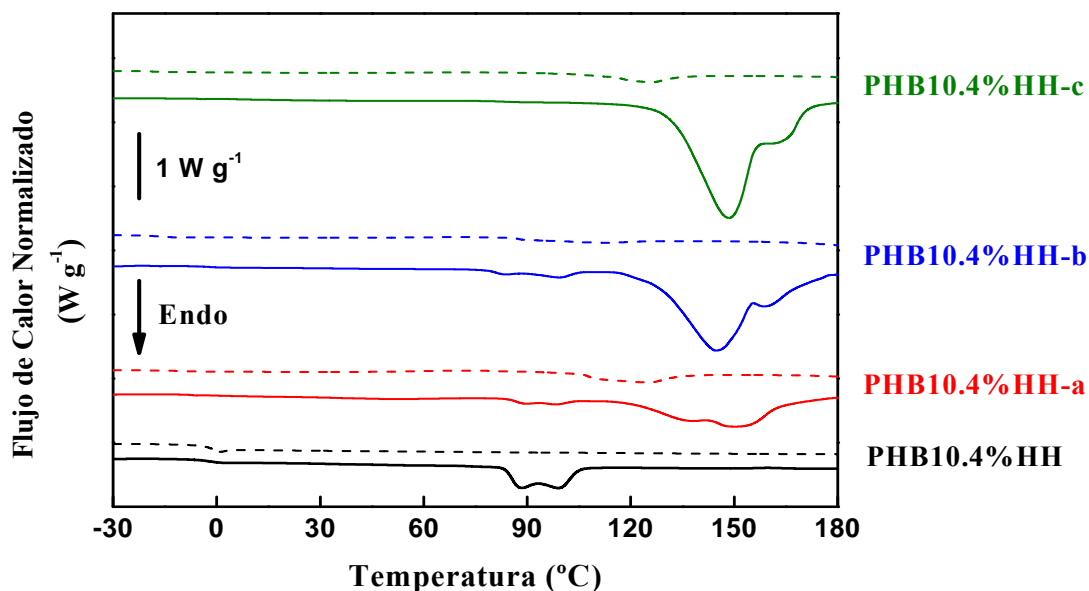


Figura IV-4: Termogramas normalizados de DSC del primer (—) y segundo barrido (----) de la película del PHB10.4%HH sin carga y con las tres cantidades estudiadas de las dos microcargas, PHB10.4%HH-a (18.2 % (v/v)), PHB10.4%HH-b (31.6 % (v/v)) y PHB10.4%HH-c (37.1 % (v/v)). Las unidades en el eje y son arbitrarias, y las curvas se han desplazado en este eje por claridad.

Cuando se comparan los resultados obtenidos para los dos copolímeros de 3HHx, se observan algunas diferencias entre sus comportamientos térmicos. Así, para los composites PHB10.4%HH-a y -b se determinó una reducción más drástica de la entalpía de fusión del polímero (ΔH_{1-2}) con respecto a los composites de PHB14%HH. Esta reducción más acusada sugiere que la adición de mayores porcentajes de partículas en los composites puede dificultar el crecimiento de cristales en el polímero. Este efecto puede producir la desaparición de los picos de fusión durante el primer calentamiento observados para el biocomposite PHB10.4%HH-c.

Para el caso de los composites de PHB14%HH también se produce una reducción de la entalpía de fusión del polímero (ΔH_{1-2}) como consecuencia de la adición de las partículas inorgánicas, Tabla IV-2, con una reducción mayor cuando aumenta la

cantidad de partículas añadidas. Pero de modo contrario a lo observado para los composites con PHB10.4%HH, no se produjo la desaparición de los picos de fusión del P3HB3HHx en las muestras con la máxima cantidad (37.1 % (v/v), PHB14%HH-c) de cargas añadida. Es bien conocido^{39,46} que el incremento de la fracción molar de 3HHx en el copolímero reduce el tamaño de los cristales formados y la velocidad de crecimiento en el frente de las lamelas, dando lugar a una formación más rápida de cristales de menor tamaño cuando la cantidad de 3HHx se incrementa en el copolímero. Este efecto puede producir la cristalización más rápida del copolímero PHB14%HH con respecto al copolímero PHB10.4%HH, dando lugar a la aparición de los picos de fusión de la matriz polimérica en el composite PHB14%HH-c, que no se observaron en el composite PHB10.4%HH-c.

Además de la reducción en la entalpía de fusión de las muestras con el copolímero P3HB3HHx, la deshidratación del CaSO_4 produce un comportamiento térmico complejo en sus mezclas con el P3HB3HHx. Como consecuencia de este comportamiento, se observó que la adición de CaSO_4 a los biocomposites de PHB10.4%HH produce la aparición de dos picos endotérmicos durante el primer calentamiento de las muestras (Figura IV-4), correspondientes a las temperaturas denominadas T_3 y T_4 en la Tabla IV-2. Puesto que no se ha observado influencia del Bioglass® en las propiedades térmicas de los composites cuando se adiciona de modo individual, muestra PHB14%HH-1 (Figura IV-3, A) y Tabla IV-2), este comportamiento puede ser explicado bajo la asunción de una encapsulación parcial del CaSO_4 por el polímero. La aparición de estos dos picos ha sido atribuida a que el proceso de deshidratación del CaSO_4 se desdobra en dos pasos sucesivos ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4$), fraccionando el modo usual de deshidratación del CaSO_4 , que normalmente se produce en un solo paso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4$). En un sistema semicerrado o cerrado el vapor de agua no puede escapar libremente del medio de reacción y actúa como inhibidor de la reacción de deshidratación al aumentar la presión de vapor de agua en el entorno de la deshidratación. Como resultado de ello, la reacción tendrá lugar en dos pasos.⁴⁷⁻⁴⁹ Durante el primer paso (T_3 en Tabla IV-2) el CaSO_4 dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se deshidrata parcialmente al sulfato de calcio hemihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$). En el segundo paso (T_4 en Tabla IV-2) el sulfato de calcio hemihidratado se deshidrata

completamente (CaSO_4). La temperatura a la cual se producen estas dos reacciones y la diferencia de temperatura entre ellas dependen de la presión parcial de vapor.⁵⁰ En los composites de PHB10.4%HH estudiados, la relación de las entalpías de estos dos picos correspondiente al proceso de deshidratación del CaSO_4 ($\Delta H_3/\Delta H_4$, Tabla IV-2) varía en función de la cantidad de sulfato de calcio añadida, indicando un aumento del proceso que se produce a menor temperatura (ΔH_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$) a medida que se aumenta la cantidad de CaSO_4 en el composite. Este comportamiento podría deberse a la reducción de la encapsulación del CaSO_4 en la matriz polimérica cuando la cantidad de carga se incrementa, lo que reduciría la presión de vapor durante el proceso de deshidratación, favoreciendo el primer paso de la deshidratación.

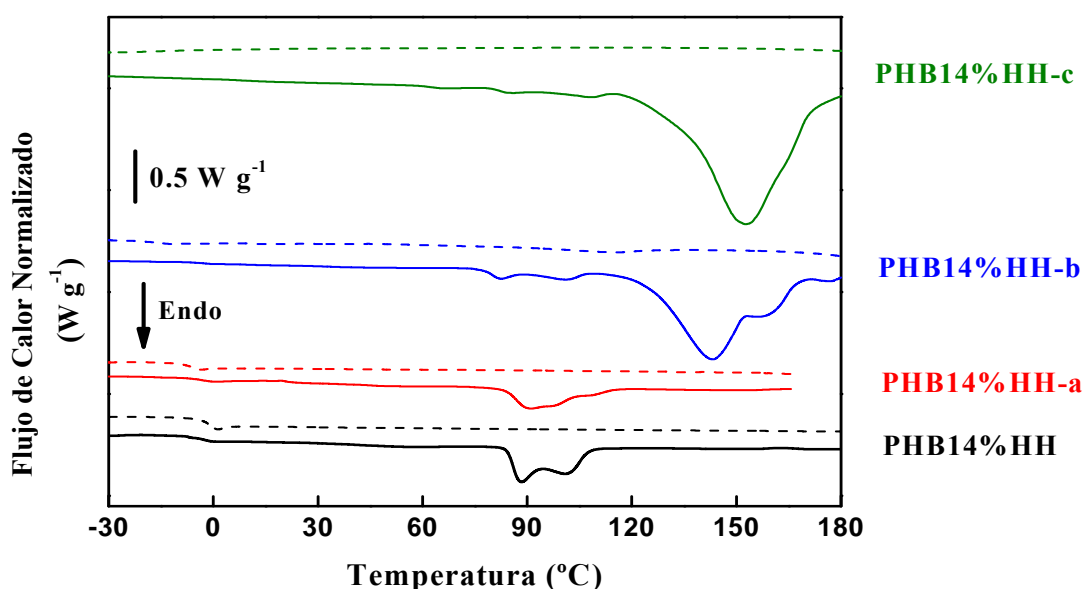


Figura IV-5: Termogramas normalizados de DSC del primer (—) y segundo barrido (----) de la película del PHB14%HH sin carga y con las tres cantidades estudiadas de las dos microcargas, PHB14%HH-a (18.2 % (v/v)), PHB14%HH-b (31.6 % (v/v)) y PHB10.4%HH-c (37.1 % (v/v)). Las unidades en el eje y son arbitrarias, y las curvas se han desplazado en este eje por claridad.

En contraste con lo observado para los composites de PHB10.4%HH, la adición de partículas inorgánicas en los biocomposites PHB14%HH-a, -b y -c, no produce la aparición de dos picos endotérmicos. En cambio, la interacción del PHB14%HH con las microcargas da lugar a diferentes efectos: (i) PHB14%HH-a y -c sólo muestran el pico de deshidratación del CaSO_4 ($\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4$), cuya temperatura puede

variar entre 90-160 °C en un sistema abierto,^{48,50} lo que indica que es posible que no se produzca encapsulamiento parcial del CaSO_4 en estos composites y (ii) PHB14%HH-b presenta el pico de la deshidratación del CaSO_4 en un sistema cerrado, con la presencia de un hombro para PHB14%HH-b en el pico endotérmico. Este hombro podría indicar una encapsulación parcial del sulfato de calcio en la matriz polimérica, dando lugar a una leve deshidratación del $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en dos pasos. Esta posibilidad está soportada porque el valor de la entalpía de este pico es el más elevado de los medidos para los biocomposites con PHB14%HH. Cuando no se produce encapsulación parcial el proceso de deshidratación se produce en un paso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4$), tal y como se ha observado para los composites PHB14%HH-a y -c.

Tal y como cabría esperar, como consecuencia de la adición de mayores cantidades de sulfato de calcio a los composites, e independientemente del copolímero de P3HB3HHx empleado, se produce un incremento de la entalpía ΔH_{3-4} dependiente de la cantidad de CaSO_4 añadida para todos los biocomposites estudiados. Para estos copolímeros, la reducción en la cristalinidad de los polímeros debida al incremento en la cantidad de microcargas añadidas puede producir un aumento en la velocidad de degradación de los composites con respecto a la de las películas de los polímeros, ya que, cuanto menor es el grado de cristalinidad de los polímeros mayor es la velocidad de degradación de los polímeros.^{40,41}

Los composites basados en PHBHV presentan un comportamiento térmico diferente al observado con los copolímeros de P3HB3HHx tal y como se puede deducir de los valores presentados en la Tabla IV-2 y de la forma de los termogramas presentados en la Figura IV-6.

La adición de partículas a esta matriz polimérica no produce un comportamiento unidireccional de los valores de entalpía medidos, con un ligero aumento para los composites PHBHV-a y -b con 18.2 % (v/v) y 31.6 % (v/v) respectivamente de ambas cargas. Sin embargo, la tendencia inicial se rompe para el composite con el 37.1 % (v/v), PHBHV-c, cuya entalpía se reduce ligeramente. Para interpretar estos resultados hay que tener en cuenta que los picos de fusión del copolímero se producen a unas temperaturas similares a las de la deshidratación del sulfato de calcio y, por esta razón, no es posible evaluar unilateralmente las posibles variaciones en la cristalinidad asociadas al polímero. Esta coincidencia de las temperaturas de fusión del PHBHV y/o

deshidratación del CaSO₄ también impide llevar a cabo el estudio térmico del proceso de fusión del polímero y la influencia que la adición del sulfato de calcio podría tener en las propiedades térmicas de los biocomposites.

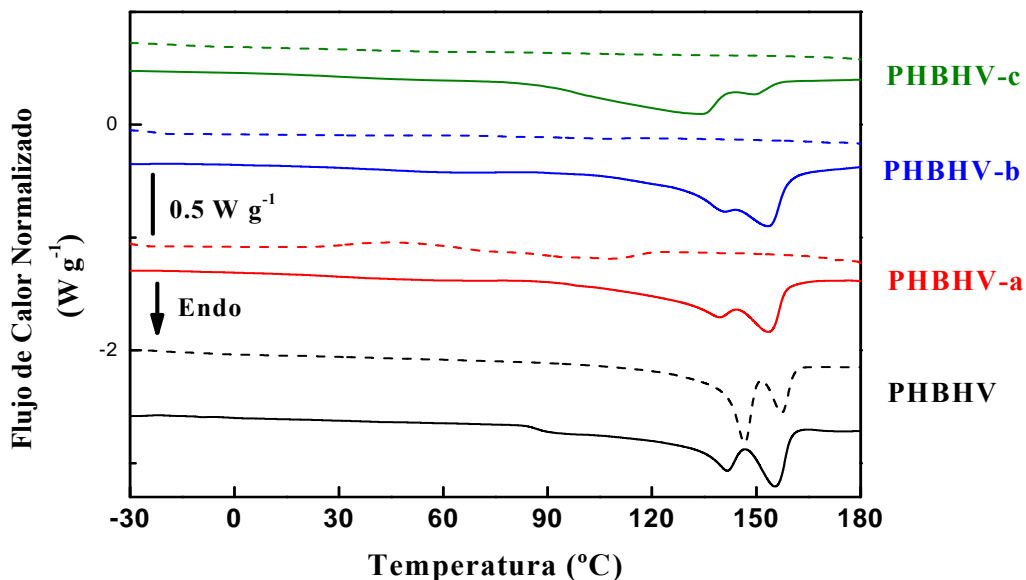


Figura IV-6: Termogramas normalizados de DSC del primer (—) y segundo barrido (-----) de la película del PHBHV sin carga y con las tres cantidades estudiadas de las dos microcargas, PHBHV-a (18.2 % (v/v)), PHBHV-b (31.6 % (v/v)) y PHBHV-c (37.1 % (v/v)). Las unidades en el eje y son arbitrarias, y las curvas se han desplazado por claridad.

IV-3.3. OBSERVACIÓN DE LOS BIOCOPOLÍMEROS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La distribución de las partículas en los composites se estudió mediante microscopía electrónica de barrido. La Figura IV-7 muestra las imágenes obtenidas por SEM de una sección transversal de todos los composites con las dos microcargas (Bioglass[®] y CaSO₄) en la mayor y menor cantidad de cargas, 18.2 % (v/v) y 37.1 % (v/v) respectivamente.

La diferencia en el tipo de polímero empleado para obtener los composites, se aprecia en la formación de pequeños orificios en la matriz de los composites obtenidos con los copolímeros con 3HHx, b y c₂, Figura IV-7, independientemente de la cantidad molar de 3HHx. Estos orificios pueden ser atribuidos a la evaporación del cloroformo durante el proceso de fabricación.⁵¹

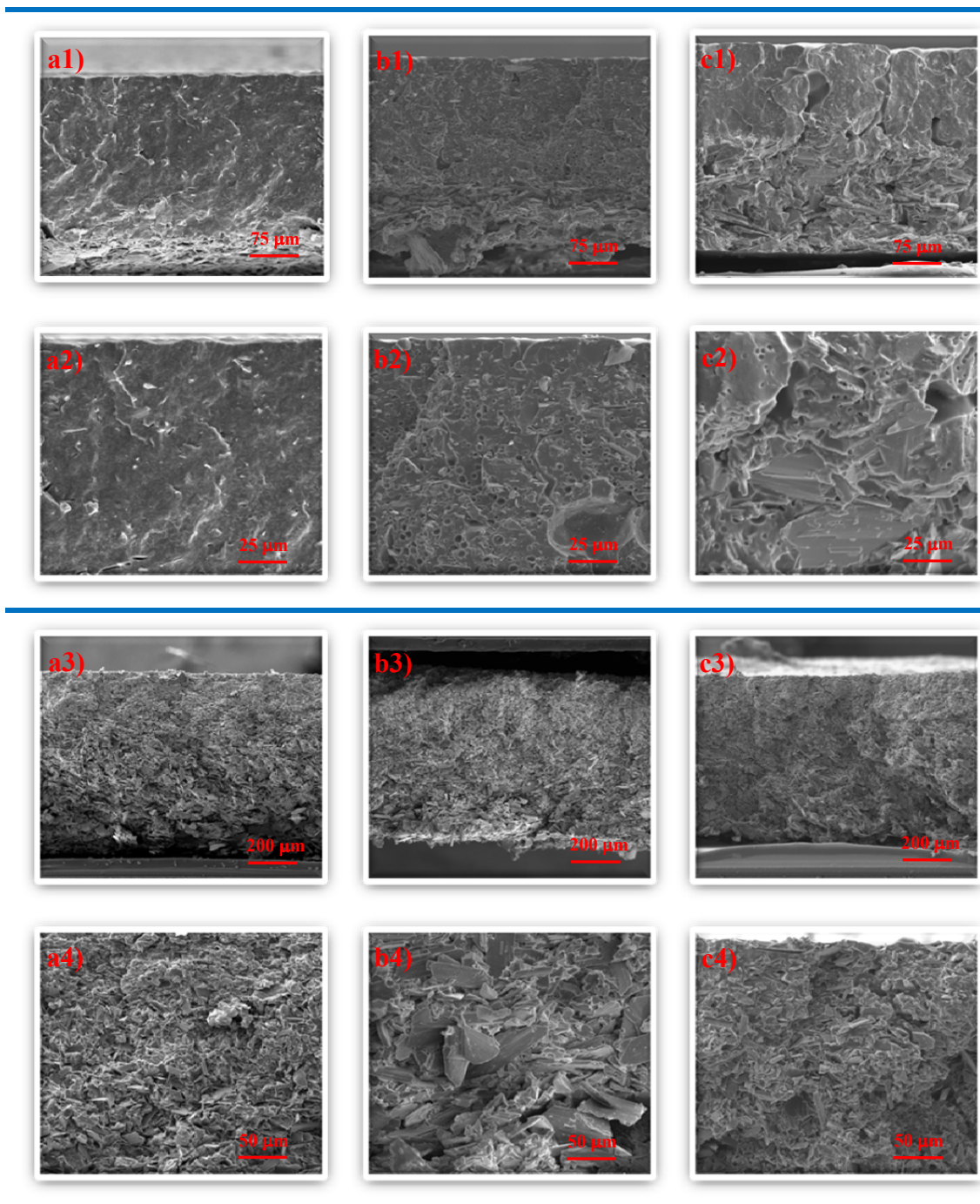


Figura IV-7: Imágenes de SEM de a1_2) PHBV-a, a3_4) PHBV-c, b1_2) PHB10.4%HH-a, b3_4) PHB10.4%HH-c, c1_2) PHB14%HH-a y c3_4) PHB14%HH-c.

En las muestras con la menor concentración de partículas (18.2 % (v/v)), se observó una buena distribución de las mismas en la matriz polimérica, independientemente del copolímero empleado, con una mínima deposición de las cargas en la parte inferior del composite, a, b y c_1, Figura IV-7. Para los composites con la mayor cantidad de ambas cargas 37.1 % (v/v) de cada una (PHBV-c, PHB10.4%HH-c y

PHB14%HH-c), la sedimentación de partículas en la parte inferior del composite es más evidente, con una apreciable cantidad de las microcargas en la parte inferior de las muestras (a, b y c_3, Figura IV-7). El elevado porcentaje de cargas en estos composites, superior a la cantidad de polímero (25.9 % (v/v)), hace que la densidad de la disolución de polímero sea insuficiente para evitar la decantación de las partículas durante el proceso de obtención de los composites por el método de colada.

Un estudio más detallado de la interacción matriz polimérica-microcargas se llevó a cabo mediante la observación por SEM de una sección transversal de los composites con 31.6 % (v/v) de cada una de las cargas (PHBHV-b, PHB10.4%HH-b y PHB14%HH-b), Figura IV-8.

Al igual que para los composites con el 37.1 % (v/v) de partículas (Figura IV-7, a, b y c_4) se observó una gran cantidad de Bioglass[®] y CaSO₄ depositados en la parte inferior de las muestras. Tal y como cabría esperar, la deposición de las partículas se produce por tamaños, con las partículas más grandes en el fondo de la película. De modo general se puede concluir que existe una buena interacción entre los dos tipos de microcargas y las tres matrices poliméricas, con las partículas recubiertas con una capa homogénea de polímero. El proceso de obtención de los composites, con la disolución del polímero y la posterior evaporación del disolvente, no debe conducir a la modificación de la estructura química del polímero o su reacción con las cargas, con lo que la interacción entre la matriz polimérica y las microcargas debe producirse una débil interacción intermolecular, mediante fuerzas de Van der Waals y la formación de enlaces de H entre los grupos funcionales C=O y O-H de la matriz polimérica, con los diferentes grupos funcionales de las cargas.

El recubrimiento de las partículas por los polímeros se puede observar con detalle en las imágenes a, b y c_3 de la Figura IV-8. Sólo el copolímero PHB10.4%HHx muestra una interacción más pobre, lo que da como resultado la aparición de agujeros, marcados con flechas rojas en la Figura IV-8 b_2, durante el proceso de preparación de la muestra para su observación por SEM. Estos agujeros pueden ser considerados como la huella dejada por las partículas al ser arrancadas de la matriz polimérica al realizar la fractura transversal a baja temperatura de la muestra, como consecuencia de la menor interacción matriz polimérica-microcargas. A excepción de las huellas anteriormente indicadas para la muestra PHB10.4%HH-b, la observación detallada de la interfase

polímero-carga mediante SEM (a, b y c_3, Figura IV-8), muestra el recubrimiento de las microcargas por la matriz polimérica con una distribución homogénea de los distintos P3HAs entre el Bioglass[®] y el CaSO₄.

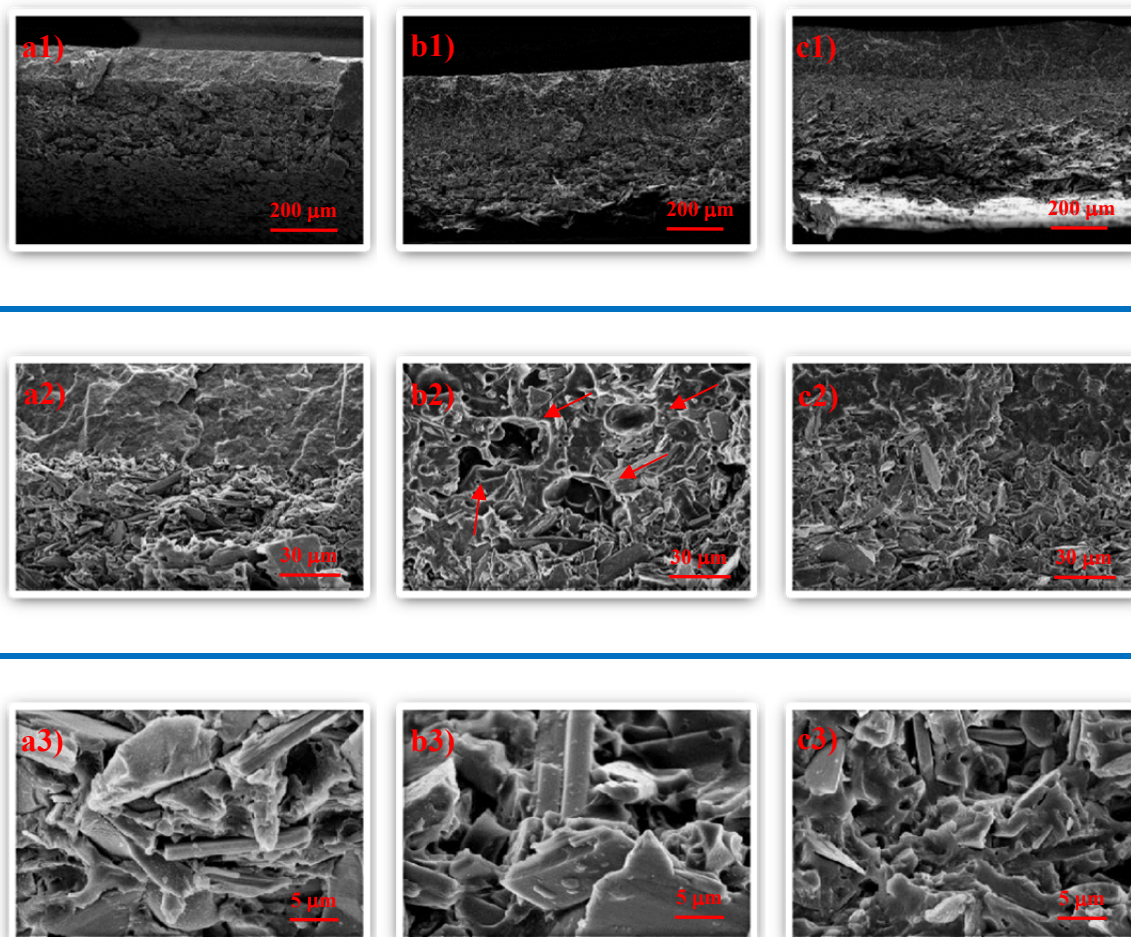


Figura IV-8: Imágenes de SEM a distintos aumentos de una sección transversal de los composites a1_3) PHBHV-b, b1_3) PHB10.4%HH-b y c1_3) PHB14%HH-b.

A fin de obtener información orientativa de las superficies de los composites, las muestras con 31.6 % (v/v) de cada carga, se observaron mediante microscopía electrónica de barrido a modo de ejemplo.

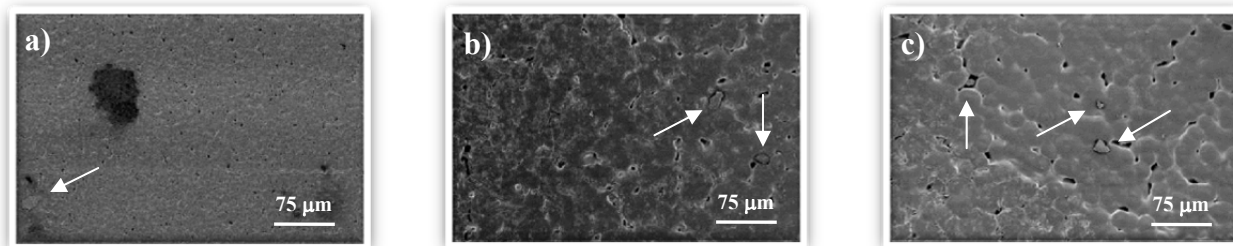


Figura IV-9: Imágenes de SEM de a) PHBHV-b, b) PHB10.4%HH-b y c) PHB14%HH-b.

Tal y como se puede observar en la Figura IV-9 los composites obtenidos con los copolímeros con 3HHx presentan superficies un poco más rugosas con la presencia de agujeros de mayor tamaño. Estas diferencias están asociadas con el diferente grado de cristalinidad de los copolímeros y se producen durante el proceso de evaporación del disolvente.⁵¹ Ambos polímeros son semicristalinos, lo que origina que durante la evaporación del disolvente en el proceso de obtención de los composites ambos cristalicen, produciendo estrés dentro del polímero y originando la rugosidad apreciada en las superficies.⁵² Como consecuencia del proceso de isodimorfismo⁵³ producido en el P3HB3HV la homogeneidad de las superficies es mayor y la presencia de orificios es menor, siendo los orificios en el P3HB3HV más pequeños.

Sin embargo, tan sólo se observó una pequeña cantidad de partículas en la superficie (indicadas con flechas blancas en las imágenes), indicativo de que la mayoría de las partículas se encuentran embebidas en la matriz polimérica, a pesar de que para las muestras observadas y empleadas como ejemplo, la cantidad global de partículas 63.2 % (v/v), es aproximadamente un 25 % superior a la cantidad de polímero presente en el composite, 36.8 % (v/v).

IV-3.4. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS COMPOSITES

La utilización del Bioglass[®] y del CaSO₄ como materiales para la regeneración de tejido óseo está limitada por sus inexistentes propiedades mecánicas. A pesar de que en el caso del Bioglass[®] se han conseguido sinterizar estructuras tridimensionales que mantienen la capacidad de generación de HA de este biovidrio, estas estructuras siguen careciendo de las adecuadas propiedades mecánicas para su uso extensivo en

regeneración ósea.²⁰ El uso del CaSO_4 se ha visto siempre limitado por sus características estructurales, sin estabilidad mecánica, siendo posible su uso sólo como relleno y portador de factores osteoconductores, favoreciendo de este modo el crecimiento del hueso.³²⁻³⁴

Por ello, la capacidad de presentar ambos materiales con una estabilidad mecánica suficiente para su manipulación durante el proceso de regeneración tisular supone un primer paso para la implementación de una combinación de ambos materiales en el desarrollo de un sustrato biodegradable utilizable en la regeneración ósea. Con este objetivo se han empleado las matrices poliméricas en el presente capítulo y en este apartado se evalúan las propiedades mecánicas de los biocomposites obtenidos mediante DMTA y ensayos esfuerzo-deformación.

IV-3.4.1. ANÁLISIS TERMO MECANODINÁMICO

Los copolímeros de PHB, dado que son polímeros viscoelásticos, almacenan energía mecánica sin disiparla (medida como módulo de almacenamiento, E'), y también disipan energía empleándola para su deformación (medida como módulo de pérdida, E''). El uso de la técnica de DMTA ha demostrado ser de gran utilidad para evaluar las propiedades viscoelásticas de los polímeros y los composites.^{40,54,55} En el presente apartado las medidas se realizaron a la frecuencia de 1 Hz, midiendo E' y E'' en función de la temperatura y obteniéndose los resultados mostrados en la Figura IV-10. No fue posible medir los composites con la mayor cantidad de carga (37.1 % (v/v)), puesto que no resistieron la manipulación necesaria para llevar a cabo la medida.

El módulo de almacenamiento nos permite medir la capacidad de un material para almacenar energía mecánica y resistir la deformación, aportando valiosa información sobre la capacidad de los composites para soportar la manipulación durante el proceso de ingeniería tisular. E' disminuye con el incremento de la temperatura de medida para todos los composites. Comparado con las películas de polímero empleadas como referencia, sólo se produce un incremento en el módulo de almacenamiento para los composites PHBHV-a y PHB10.4%HH-b en el rango evaluado de -50-50 °C (Tabla IV-3). Este comportamiento de reducción de E' con la adición de las cargas puede deberse a los agujeros que se forman entre las partículas durante la preparación de los composites como se observó en las imágenes de SEM (Figuras IV-7 a IV-9).

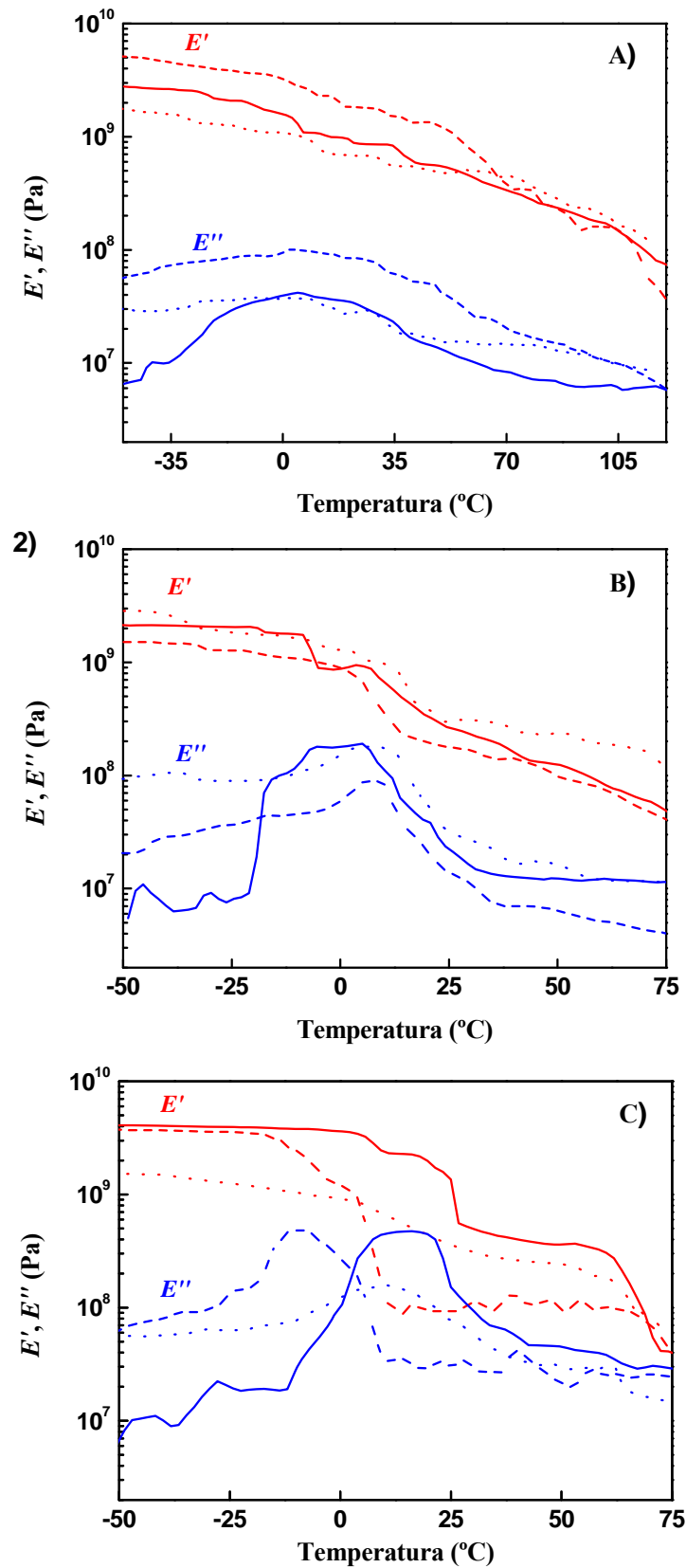


Figura IV-10: Representación de la dependencia con la temperatura de E' y E'' para los biocomposites de A) PHBHV, B) PHB10.4%HH y C) PHB14%HH medida a un 1 Hz. (—) películas de los polímeros sin carga, (- - -) biocomposites con 18.2 % (v/v) de Bioglass[®] y CaSO₄ y (.....) biocomposites con 31.6 % (v/v) de ambas microcargas.

El efecto de las partículas en la fase amorfa (viscosa) de los copolímeros de PHB en los composites también se observa en la Figura IV-10, donde se representa el módulo de pérdida frente a la temperatura. Para los composites de P3HB3HV y PHB10.4%HH se observó el mismo comportamiento que para E' , mientras que en el caso de los composites de PHB14%HH se observó un aumento de E'' en el rango de temperaturas -50-0 °C, con un decremento posterior a 50 °C.

Tabla IV-3: Módulo de almacenamiento (E') y de $\tan \delta$ para los biocomposites estudiados a distintas temperaturas.

	Muestra	-50 °C	0 °C	50 °C
Módulo de Almacenamiento (E') (unidades 10^9 Pa)	PHBHV	2.78	1.60	0.54
	PHBHV-a	5.15	3.21	1.23
	PHBHV-b	1.77	1.09	0.48
	PHB10.4%HH	2.14	0.88	0.12
	PHB10.4%HH-a	1.51	0.89	0.10
	PHB10.4%HH-b	2.85	1.29	0.24
	PHB14%HH	4.09	3.61	0.36
	PHB14%HH-a	3.74	1.19	0.09
	PHB14%HH-b	1.52	0.92	0.24
$\tan \delta$	PHBHV	0.09	0.38	0.83
	PHBHV-a	0.28	0.70	0.94
	PHBHV-b	0.50	0.95	1.06
	PHB10.4%HH	0.02	2.78	2.00
	PHB10.4%HH-a	0.25	1.04	1.40
	PHB10.4%HH-b	0.48	1.58	1.29
	PHB14%HH	0.02	0.29	1.28
	PHB14%HH-a	0.17	2.19	2.33
	PHB14%HH-b	0.38	1.36	1.21

En un composite de matriz polimérica la disipación de energía puede producirse también en la interfase cargas-matriz, donde se produce la fricción entre las dos fases. La fricción interna o amortiguamiento puede ser cuantificado mediante la $\tan \delta$, que es la relación entre la energía disipada por ciclo y la energía almacenada durante ese mismo ciclo ($\tan \delta = E''/E'$). Una gran fricción se traduce en una disminución de la estabilidad mecánica. En este sentido, se determinó que para los composites de P3HB3HV en todo el rango de temperaturas estudiado, y para los composites de P3HB3HHx en el rango de temperaturas de -50-25 °C, la adición de las cargas produce un aumento de $\tan \delta$; Esto es, la capacidad de amortiguamiento de los biocomposites se incrementa. Este comportamiento se puede producir cuando en el composite se

introduce un nuevo mecanismo de amortiguamiento que no existía en el polímero sin cargas. Existen varias posibles explicaciones para este fenómeno: (i) la fricción partícula-partícula cuando las cargas se tocan entre sí, por ejemplo en los aglomerados que se pudieran formar, (ii) fricciones entre el polímero y las cargas en las zonas en las que no se produce adhesión en la interfase, y (iii) como consecuencia de un exceso de amortiguamiento en el polímero en la zona cercana a la interfase debido al estrés térmico inducido o a cambios en la conformación o morfología del polímero.

A 50 °C, en los composites de ambos copolímeros de P3HB3HHx, la adición de partículas suele limitar la movilidad de la fase amorfa de la matriz produciendo una reducción del amortiguamiento en los composites (Tabla IV-3). Esto podría esperarse, ya que un incremento en la cantidad de microcargas añadidas produce una reducción en el volumen de polímero y por tanto en la capacidad de amortiguación general del composite. Este comportamiento se observó en los composites obtenidos con los copolímeros de P3HB3HHx a 50 °C debido a su menor temperatura de fusión con respecto al P3HB3HV, lo que produce un mayor incremento de la movilidad de las cadenas poliméricas a esta temperatura. Por lo tanto, el E'' de los copolímeros con 3HHx incrementa con la temperatura, y por ende su capacidad para disipar energía durante la deformación.

IV-3.4.2. ENSAYOS DE ESFUERZO-DEFORMACIÓN

Las propiedades mecánicas también se evaluaron mediante ensayos de esfuerzo-deformación en condiciones estáticas. Con objeto de minimizar las variables que influyen en las propiedades mecánicas, permitiendo una mejor comprensión del proceso, se redujeron las variables de estudio, acotándose en la cantidad de carga añadida y centrándose en el tipo de carga y de polímero. Para ello, se estudiaron las películas de los polímeros sin carga y con el 31.6 % (v/v) de ambas cargas; esto es, las muestras PHBHV, PHBHV-b, PHB10.4%HH, PHB10.4%HH-b, PHB14%HH y PHB14%HH-b, que permitirán determinar la influencia de ambas cargas y del tipo de matriz polimérica en las propiedades mecánicas. Con el fin de estudiar la influencia del tipo de carga se escogieron los biocomposites PHB14%HH-1 y PHB14%HH-2 como referencia, con 46.2 % (v/v) de Bioglass[®] y 46.2 % (v/v) de CaSO₄ respectivamente.

Para las películas de polímeros sin carga el comportamiento observado es coherente con las medidas para películas antes del proceso de envejecimiento, Tabla IV-4. Así, el Módulo de Young (E), el esfuerzo máximo de tracción (σ_{max}), la elongación a rotura (ε_r), el esfuerzo en el punto de fluencia (σ_f) y la elongación en el punto de fluencia (ε_f) son similares para los dos copolímeros de 3HHx, de modo independiente a la fracción molar de monómero, indicativo de que no existen diferencias significativas en las propiedades mecánicas de estos dos copolímeros en las condiciones de experimentación empleadas.

Tabla IV-4: Resultados obtenidos de los ensayos de esfuerzo-deformación para los composites estudiados y las películas de los polímeros. E : Módulo de Young; σ_{max} = esfuerzo máximo de tracción; ε_r : elongación a rotura; σ_f : esfuerzo en el punto de fluencia; ε_f : elongación en el punto de fluencia.

Muestra	E (MPa)	σ_{max} (MPa)	ε_r (%)	σ_f (MPa)	ε_f (%)
PHBHV	278.6 ± 22.2	12.9 ± 1.3	88.2 ± 16.3	12.8 ± 1.3	18.9 ± 1.3
PHBHV-b	117.9 ± 1.7	3.8 ± 0.1	7.3 ± 1.2	3.8 ± 0.1	6.0 ± 0.7
PHB10.4 %HH	202.9 ± 11.3	11.3 ± 0.6	494.3 ± 27.4	8.2 ± 0.2	10.8 ± 0.4
PHB10.4 %HH-b	99.8 ± 10.1	3.1 ± 0.3	20.6 ± 2.8	-	-
PHB14 %HH	221.7 ± 8.5	12.6 ± 0.7	483.4 ± 30.4	8.8 ± 0.5	7.6 ± 0.9
PHB14 %HH-1	142.0 ± 7.3	4.7 ± 0.3	15.0 ± 1.3	-	-
PHB14 %HH-2	141.4 ± 7.7	4.6 ± 0.2	25.2 ± 0.6	-	-
PHB14 %HH-b	99.3 ± 17.8	3.3 ± 0.5	22.5 ± 2.7	-	-

Después de la incorporación de 46.2 % (v/v) de Bioglass[®] (muestra PHB14%HH-1) o 46.2 % (v/v) de CaSO₄ (muestra PHB14%HH-2), se comprobó que las variables E , σ_{max} y ε_r están en el mismo rango para las dos muestras, concluyéndose que las diferencias con la películas de polímeros sin carga son independientes del tipo de microcarga añadida. Incluso si no se han observado diferencias significativas entre los composites conteniendo sólo un tipo de carga, la adición de partículas a la matriz polimérica produce una reducción significativa de las propiedades mecánicas de los composites en comparación con las de las películas de polímero empleadas como referencia.

La incorporación de ambas cargas, composites PHBHV-b, PHB10.4%HH-b y PHB14%HH-b, reduce drásticamente la elongación a rotura, con disminuciones del 91.7 %, 95.8 % y 95.4 % respectivamente, reflejando la gran influencia de la adición de

partículas en las propiedades mecánicas de los composites. Este hecho puede ser entendido teniendo en cuenta que la adición de cantidades cada vez mayores de partículas reduce la cantidad de polímero accesible a la elongación, reduciendo de este modo la elongación máxima a rotura. Del mismo modo, para todos los composites conteniendo ambos tipos de cargas estudiados, se observó una disminución en E y σ_{max} , con reducciones de estas variables similares en todos los casos y próximas al 55 % y 72 %, respectivamente.

Incluso si las imágenes de SEM mostraban un buen recubrimiento de las partículas por la matriz polimérica (Figuras IV-7 y IV-8), la reducción en las propiedades mecánicas podría deberse a un efecto de mal mojado de las partículas, lo que daría como resultado que la fuerza de adhesión entre las partículas y el polímero disminuyera o incluso se eliminara. Este fenómeno también reduciría la superficie de polímero en contacto con las cargas, lo que reduce la eficiencia de las cargas en mejorar el módulo elástico.⁴⁵ Como consecuencia del método empleado para dispersar las cargas en las matrices poliméricas, se observaron aglomerados en los composites. Los aglomerados actúan como puntos débiles en el material ya que se rompen fácilmente cuando se les aplican esfuerzos, y actuando de este como puntos de acumulación de esfuerzos dando lugar a microroturas.⁵⁴ Incluso si este comportamiento produce una reducción generalizada de las propiedades mecánicas de todos los materiales estudiados, se comprobó que los composites mantenían la suficiente estabilidad mecánica para ser manejados con seguridad.

El comportamiento característico de los polímeros semicristalinos en los ensayos de esfuerzo-deformación, con una zona de deformación elástica, seguida de un punto de fluencia tras el que se produce la deformación de las muestras antes de su rotura, se observó para todas las películas de los polímeros sin carga y la muestra PHBHV-b, tal y como se observa en la Figura IV-13.

Como se puede observar en la Figura IV-13, la adición de cargas a ambas matrices de P3HB3HHx revierte este comportamiento distintivo, sin que se aprecie el punto de fluencia. La marcada pérdida de propiedades mecánicas puesta de manifiesto en los valores presentados en la Tabla IV-4, puede ser observada en las curvas de esfuerzo-deformación de la Figura IV-13, donde la dramática reducción en los valores de esfuerzo máximo y la elongación a rotura se ven con claridad.

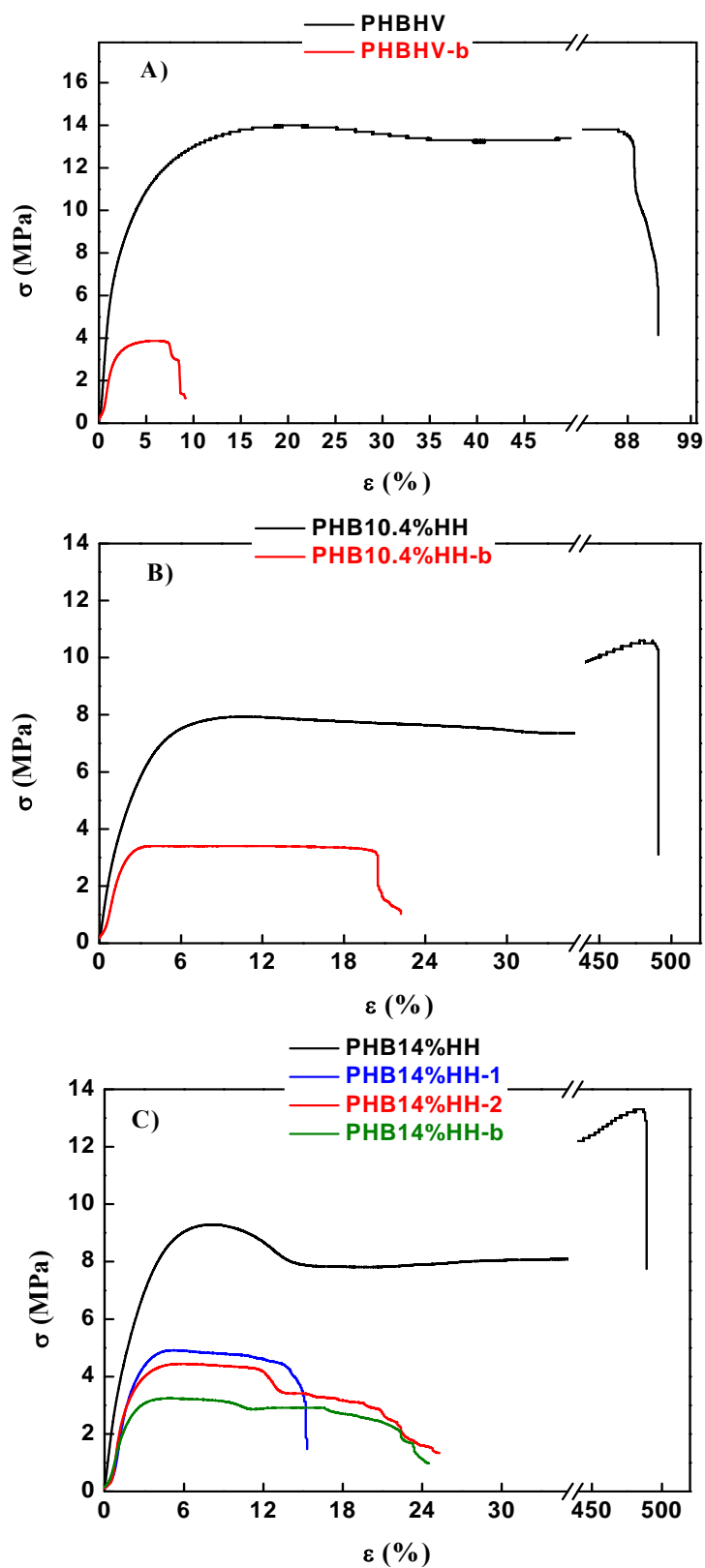


Figura IV-13: Curvas de esfuerzo-deformación para A) PHBHV y PHBHV-b, B) PHB10.4%HH y PHB10.4%HH-b y C) PHB14%HH, PHB14%HH-1, PHB14%HH-2 y PHB14%HH-b.

IV-3.5. EVALUACIÓN DE LA HUMECTABILIDAD DE LA SUPERFICIE DE LOS BIOCOMPOSITES

Puesto que la humectabilidad de los biomateriales es de interés para las aplicaciones biomédicas que engloban la interacción células-biomaterial,⁵⁶ la hidrofiliidad de la superficie de algunos composites empleados como referencia se midió mediante el método de la gota estática. Las superficies que son relativamente más mojables con valores de ángulo de contacto más bajos (θ) se denominan superficies hidrofílicas, mientras que las superficies menos mojables con valores de θ más elevados se consideran superficies hidrofóbicas. Incluso si estos términos son relativos, se ha sugerido el empleo del valor de $\theta = 65^\circ$ para diferenciar entre ambos regímenes, hidrofiliidad e hidrofobicidad.⁵⁷ Tal y como se puede observar en la Tabla IV-5 los valores de ángulo de contacto para las películas de los polímeros sin carga son superiores a 65° , considerándose por tanto hidrofóbicos.

Tabla IV-5: Valores de ángulo de contacto, medidos mediante el método de la gota estática, presentados como la media de 4 medidas en diferentes puntos de una muestra y presentados como la media \pm la desviación estándar.

Muestra	Ángulo de Contacto ($^\circ$)	Desviación Estándar (\pm)
PHBHV	78.9	1.4
PHBHV-b	56.9	2.8
PHB10.4%HH	87.4	1.1
PHB10.4 %HH-b	69.9	1.5
PHB14 %HH	92.5	1.9
PHB14 %HH-1	72.8	1.5
PHB14 %HH-2	89.0	2.4
PHB14 %HH-b	77.2	1.0

Las películas obtenidas con los copolímeros de 3HHx presentan superficies más hidrofóbicas que las del copolímero P3HB3HV como consecuencia de la presencia del monómero de 3HHx. Este monómero aumenta el ángulo de contacto de las películas, siendo 5° superior para la película de PHB14%HH que para la de PHB10.4%HH, con un aumento de sólo el 4 % molar de 3HHx.

Se añadió la misma cantidad (46.2 % (v/v)) de Bioglass[®] o CaSO₄ al polímero de PHB14%HH, obteniéndose los biocomposites PHB14%HH-1 y PHB14%HH-2 respectivamente, y se evaluó la humectabilidad de su superficie mediante medidas de

ángulo de contacto. Las medidas revelaron una reducción del ángulo de contacto de los composites con respecto a las películas de polímero como consecuencia de la adición de las partículas, con la mayor reducción cuando se añadió Bioglass[®] (Tabla IV-5). Como es sabido, las películas que incorporan partículas pueden tener una mayor área superficial, lo que puede conducir a una reducción del ángulo de contacto medido con agua.⁵⁸ El Bioglass[®] podría producir una mayor variación en la rugosidad superficial de los composites que el CaSO₄ y de este modo podría contribuir a los valores de ángulo de contacto más pequeños obtenidos para los composites que contiene Bioglass[®].

Para los composites PHBHV-b, PHB10.4%HH-b y PHB14%HH-b se midió una reducción del 28 %, 20 % y 16 % respectivamente en el ángulo de contacto, con reducciones superiores cuanto mayor es la hidrofiliidad del polímero constituyente de la matriz, esto es, con las mayores reducciones en porcentaje en el orden PHBHV > PHB10.4%HH > PHB14%HH. A pesar de que todos los composites mostraron una reducción de la hidrofobicidad, sólo la muestra PHBHV-b mostró un valor de ángulo de contacto (56.9°) correspondiente a una superficie hidrofílica. El composite PHB14%HH-b (77.2°) muestra un valor de θ intermedio entre los composites obtenidos con uno solo de los dos tipos de carga, PHB14%HH-1 (72.8°) y PHB14%HH-2 (89.0°), lo que indica que no se produce un efecto sinérgico entre las dos cargas cuando se emplean de modo conjunto para la obtención de los biocomposites y que ambas influyen en la variación del ángulo de contacto medida.

Es conocido que las superficies hidrofílicas son generalmente más favorables para la adhesión y proliferación a corto plazo de osteoblastos y que además de soportar distribuciones homogéneas de crecimiento de osteoblastos humanos fetales (hFOB) y deposición mineral, también incrementan la cantidad y calidad de la mineralización de hFOB con respecto a las superficies hidrofóbicas.⁵⁶ Por estas razones, el incremento de la hidrofiliidad conseguida mediante la incorporación de partículas inorgánicas a las matrices poliméricas estudiadas en el presente capítulo, posiblemente conducirá a una mejor adhesión, proliferación y esparcimiento de los osteoblastos, lo que es importante para la aplicación deseada de los biocomposites desarrollados en la regeneración de tejido óseo.

IV-3.6. ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD *IN VITRO* DE LOS BIOCOMPOSITES MEDIANTE INMERSIÓN EN SBF

La bioactividad de los composites, evaluada en el presente capítulo a través de la formación de HA en la superficie de los composites tras la inmersión en SBF durante distintos periodos de tiempo, se estudió mediante espectroscopia Raman. La Figura IV-14 muestra los espectros Raman de las películas de polímeros sin carga, antes (0 días) y después (28 días) de la inmersión en SBF. Los tres tipos de polímero tienen un espectro similar entre ellos sin diferencias significativas en la región bajo estudio con las principales bandas en concordancia con la literatura.^{59,60} Como era de esperar, después de 28 días de inmersión en SBF no se observó el pico característico de la HA (PO_4^{3-}) a 961 cm^{-1} . Estos resultados confirman que la superficie de las películas de polímeros no son activas en la formación de HA después de la inmersión en SBF.

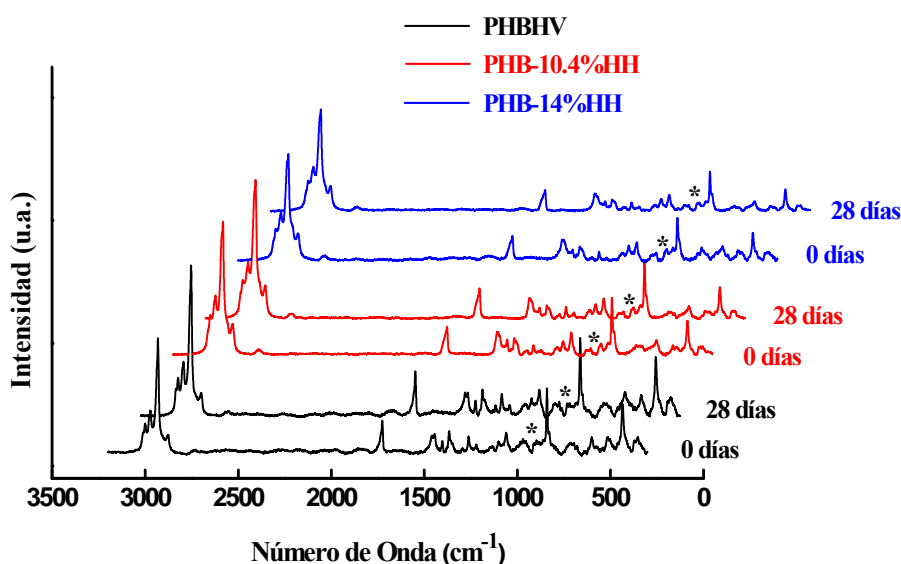


Figura IV-14: Espectros Raman de las películas de polímero sin carga para PHBHV, PHB10.4%HH y PHB14%HH antes (0 días) y después (28 días) de la inmersión en SBF.

* = posición 961 cm^{-1} .

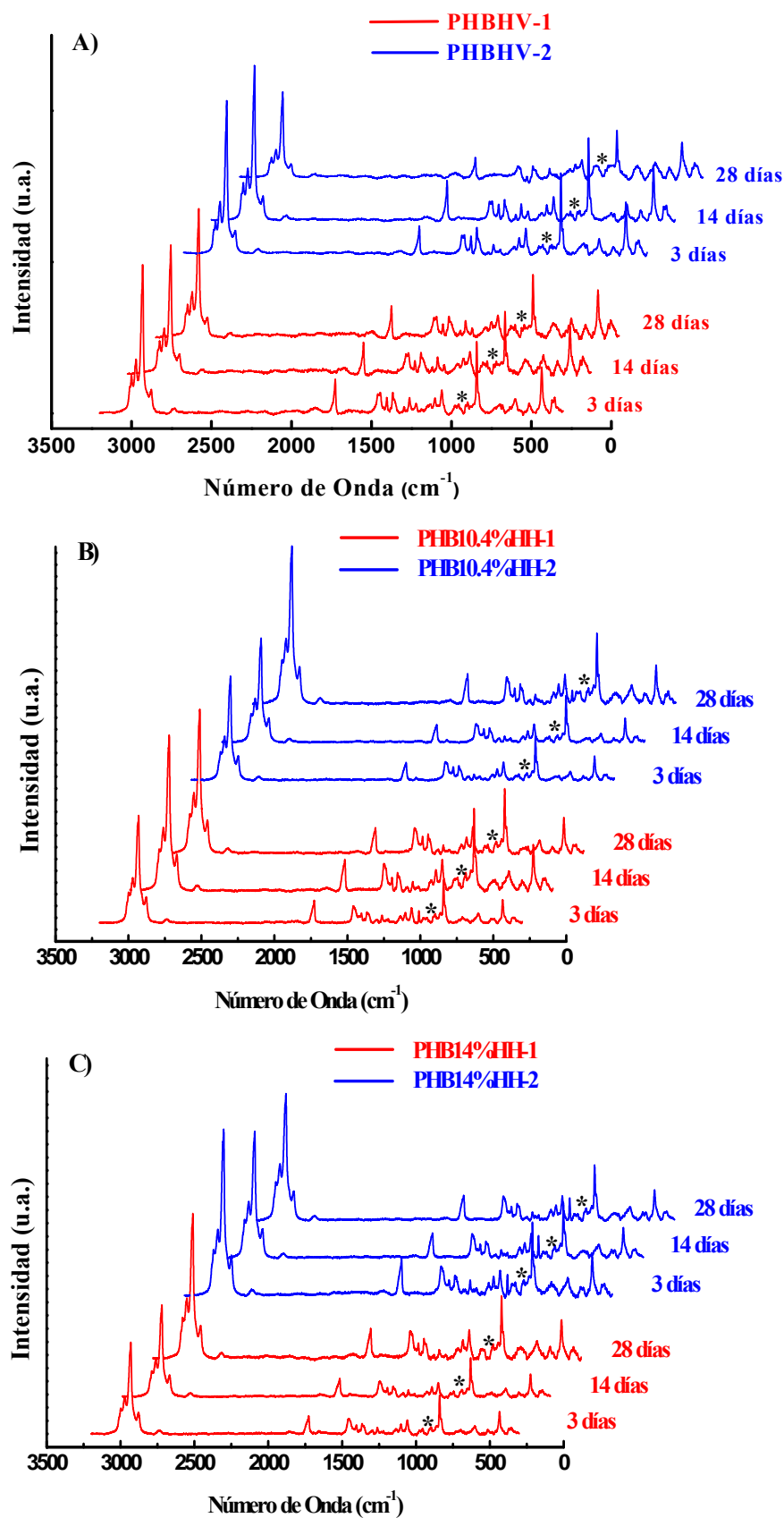


Figura IV-15: Espectros Raman después de 3-28 días de inmersión en SBF de A) PHBHV-1 y PHBHV-2, B) PHB10.4%HH-1 y PHB10.4%HH-2 y C) PHB14%HH-1 y PHB14%HH-2. * = posición 961 cm⁻¹.

La influencia de la adición de las cargas en la bioactividad de los composites también se estudió empleando la espectroscopia Raman. La Figura IV-15 muestra los espectros de los composites de los tres tipos de polímeros sólo con 46.2 % (v/v) Bioglass[®] (muestras número 1) o sólo con 46.2 % (v/v) CaSO₄ (muestras número 2), después de 3, 14 y 28 días de inmersión en SBF. El pico agudo a 961 cm⁻¹, asignado al estiramiento simétrico del enlace P-O en los grupos (PO₄³⁻) de la HA,⁶¹ no se observa en estas muestras que sólo contienen uno de los dos tipos de microcargas empleadas. Puesto que la formación de HA en biomateriales basados o que contengan Bioglass[®] está bien documentada,^{23,24,26,45,62-65} la ausencia del pico característico del (PO₄³⁻) de la HA en los espectros Raman de los composites conteniendo Bioglass[®] (muestras número 1) después de la inmersión en SBF (28 días), puede deberse a que la matriz polimérica impide el contacto de las partículas de Bioglass[®] con la disolución de SBF.

Esta misma explicación podría aplicarse a las muestras PHBHV-a, PHB10.4%HH-a y PHB14%HH-a (Figura IV-16) donde tampoco se apreció el agudo pico a 961 cm⁻¹, no pudiéndose determinar la formación de HA en la superficie de estos biocomposites en el periodo de tiempo estudiado. Sin embargo, el aumento de la cantidad de microcargas añadidas a los composites (muestras con un contenido en polímero ≤ 38.6 % (v/v)) produce la aparición del pico a 961 cm⁻¹ en los espectros Raman de todos los biocomposites, indicativo de la formación de HA en la superficie de los mismos (Figura IV-16).

Dado que no se producen cambios en la cristalinidad con el tiempo de los copolímeros de P3HB a la temperatura de estudio,⁶⁰ ni se ha medido disolución de las películas de los copolímeros después de 28 días de inmersión en SBF⁶⁶⁻⁶⁸ (determinado también mediante pesada después de 4 semanas de inmersión en SBF de las películas de todos los copolímeros empleados en el presente capítulo), se usó la banda a 1726 cm⁻¹ del P3HB para normalizar los espectros Raman y comparar la intensidad del pico a 961 cm⁻¹ de cada composite. La Figura IV-16 muestra los espectros normalizados de todos los composites en la región 920-1200 cm⁻¹, en función del tiempo de inmersión en SBF. Se observó una variación del pico atribuido a la formación de la HA tanto en función del tiempo de inmersión en SBF, como del tipo de polímero empleado para la obtención de los composites.

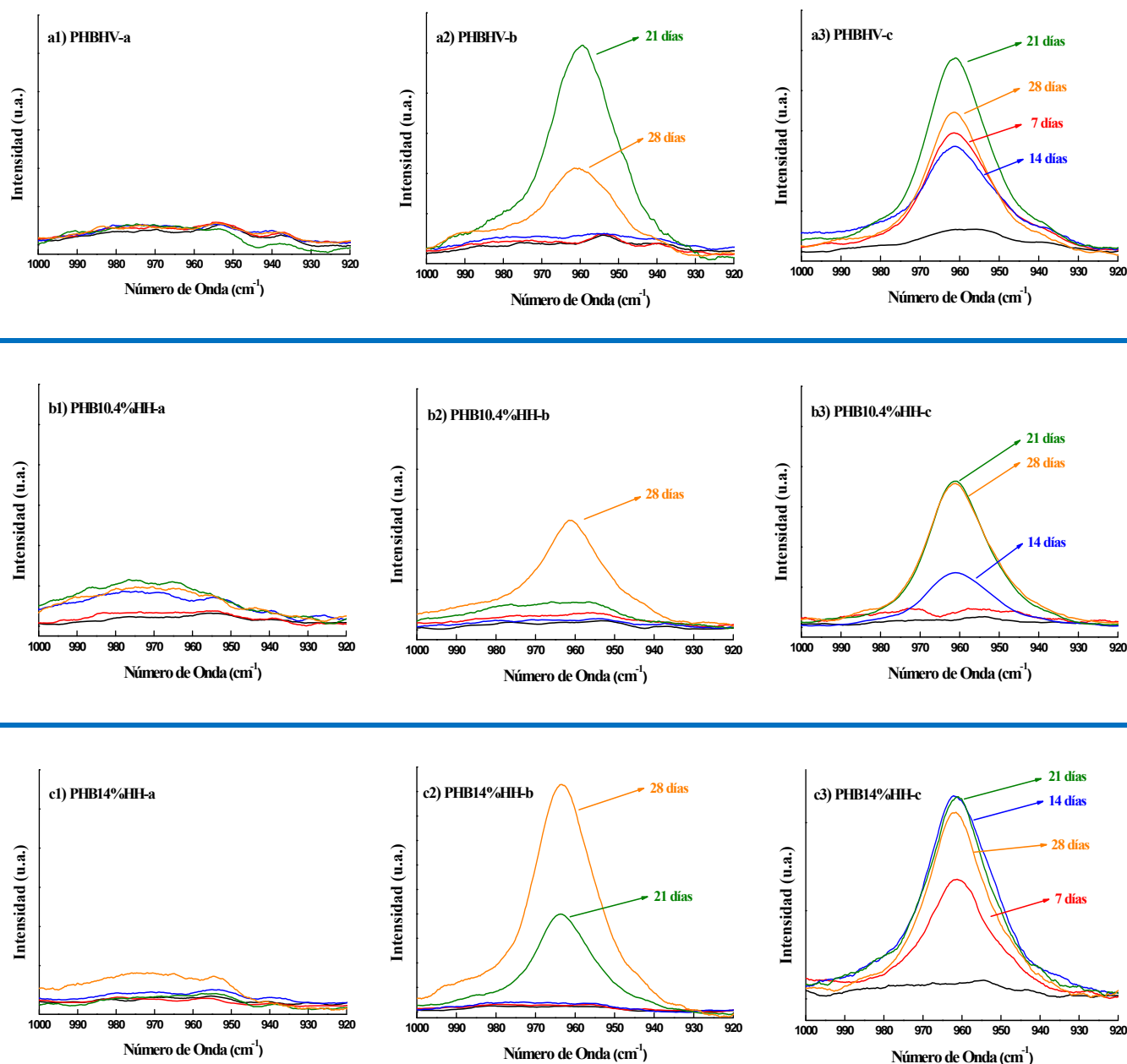


Figura IV-16: Espectros Raman de a1_3) PHBHV-a_c; b1_3) PHB10.4%HH-a_c; c1_3) PHB14%HH-a_c, en la región de $1000\text{--}920\text{ cm}^{-1}$ normalizados usando el pico dependiente de la cristalinidad del PHB a 1726 cm^{-1} .

Los composites con la menor cantidad de ambas cargas, 18.2 % (v/v) de cada una de ellas, no presentaron en ningún caso el pico a 961 cm^{-1} característico de la formación de HA (Figura IV-16, a1, b1 y c1). Dado que todas estas muestras presentan Bioglass[®] en su composición cuya capacidad para generar HA es bien conocida, la ausencia de HA en estas muestras después de 28 días en SBF puede deberse a que las

distintas matrices poliméricas actúan encapsulando completamente las cargas en estos composites, impidiendo el contacto entre la disolución y las cargas.

Para los composites PHBHV-b y PHBHV-c, Figura IV-16 a2 y a3 respectivamente, se observó que el pico a 961 cm^{-1} no incrementa linealmente con el tiempo de inmersión en SBF. Ambos biocomposites presentan la mayor intensidad del pico de la HA a 961 cm^{-1} después de 21 días de inmersión en SBF, con una reducción de la intensidad después de 28 días de inmersión. Para la muestra PHBHV-c se midió su bioactividad tan sólo 7 días después de su inmersión en SBF, con un máximo relativo de la intensidad del pico de la HA. Por tanto, para los biocomposites obtenidos con el PHBHV la variación de la intensidad del pico a 961 cm^{-1} es independiente del tiempo de inmersión en SBF. Sin embargo, la aparición del pico sí que depende de la cantidad de carga añadida al composite, apareciendo a menos tiempo de inmersión cuanto mayor es la cantidad de microcargas presentes en el composite.

Sólo después de 28 días de inmersión en SBF se detectó la presencia de HA mediante espectroscopia Raman para el composite PHB10.4%HH-b, Figura IV-16 b2, y para el composite PHB10.4%HH-c (Figura IV-16 b3) los principales cambios ocurren entre 14 y 21 días, después de los cuales se alcanzó un nivel de saturación. Este hecho se puede entender si se considera que se produce un desprendimiento de la HA formada de la superficie de los composites después de 21 días de estudio, como consecuencia de la agitación continua de las muestras en el incubador durante el procedimiento de estudio. Para los composites PHB10.4%HH la formación de HA es mayoritariamente dependiente del tiempo de inmersión en SBF y, del mismo modo que para los composites de PHBHV, sí es dependiente de la cantidad de carga añadida, como era de esperar.

La Figura IV-16 c2 y c3 muestra los espectros de los biocomposites PHB14%HH-b y PHB14%HH-c respectivamente. Para el composite PHB14%HH-b, fueron necesarios 21 días de inmersión para que se produjera la formación de HA, pero sólo 7 días se necesitaron para que se detectara el crecimiento de HA en la muestra PHB14%HH-c, que presenta un máximo de la intensidad a 14 y 21 días, con una pequeña reducción después de 28 días de estudio. Es posible concluir que para los composites con PHB14%HH existe una dependencia de la formación de HA dependiente del tiempo de inmersión en SBF y de la cantidad de microcarga añadida.

A la vista de los resultados, se puede concluir que, de modo general, para los composites obtenidos con los copolímeros de 3HHx el pico a 961 cm^{-1} incrementa con el tiempo de inmersión en SBF y la cantidad de microcargas añadidas al biocomposite, tal y como era de esperar. En conjunto, los composites más bioactivos son el PHBHV-c y PHB14%HH-c, ya que después de sólo 7 días de inmersión en SBF ambos muestran claramente el pico a 961 cm^{-1} , que se corresponde con la extensión simétrica del grupo P-O de la HA. Por tanto, el estudio mediante espectroscopia Raman confirma la naturaleza bioactiva de los biocomposites estudiados en el presente capítulo.

Para que se haya producido el crecimiento de la HA sobre la superficie de los composites se debe haber producido el contacto entre la SBF y el Bioglass[®] presente en la matriz polimérica. Puesto que no se observaron muchas partículas en la superficie de los composites (Figura IV-9), ha sido necesario que se produzca la difusión de la disolución a través de las matrices poliméricas. A pesar de que se puede producir la difusión de agua a través del polímero,⁶⁹ el procedimiento de difusión de agua más plausible es el de la filtración a través de los microporos observados en las superficies de los composites (Figura IV-9).⁶⁹ Tras el contacto entre la disolución y el Bioglass[®], la formación y posterior crecimiento de los cristales de HA llevaría a la detección de su pico característico a 961 cm^{-1} mediante microscopía Raman en la superficie de los composites, tal y como ha sido demostrado.

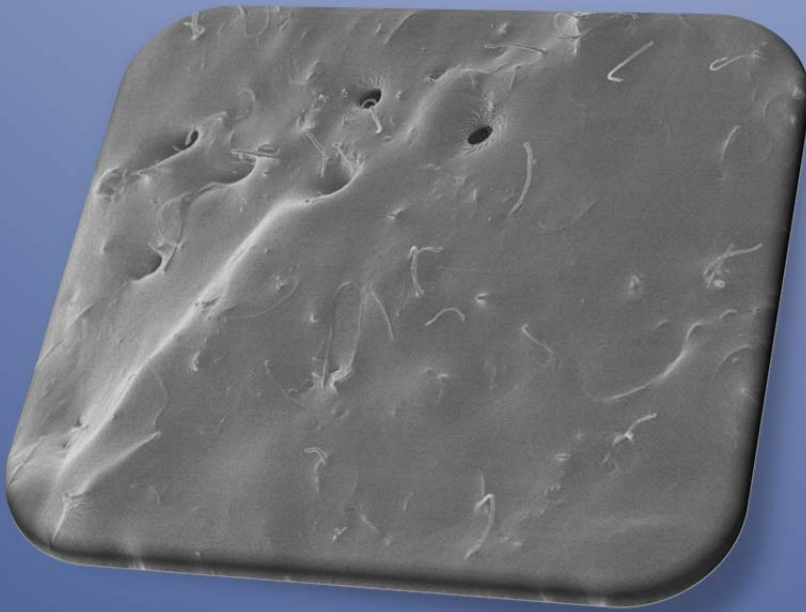
IV-4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Damien, C. J.; Parsons, J. R.; Benedict, J. J.; Weisman, D. S. *Journal of Biomedical Materials Research* **1990**, 24, 639.
- (2) Hench, L. L.; Polak, J. M. *Science* **2002**, 295, 1014+1016.
- (3) Rezwan, K.; Chen, Q. Z.; Blaker, J. J.; Boccaccini, A. R. *Biomaterials* **2006**, 27, 3413.
- (4) Guarino, V.; Causa, F.; Ambrosio, L. *Expert Review of Medical Devices* **2007**, 4, 405.
- (5) Chen, G. Q.; Wu, Q. *Biomaterials* **2005**, 26, 6565.
- (6) Hutmacher, D. W. *Biomaterials* **2000**, 21, 2529.
- (7) Doyle, C.; Tanner, E. T.; Bonfield, W. *Biomaterials* **1991**, 12, 841.
- (8) Misra, S. K.; Valappil, S. P.; Roy, I.; Boccaccini, A. R. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2249.
- (9) Young, R. C.; Terenghi, G.; Wiberg, M. *British Journal of Plastic Surgery* **2002**, 55, 235.
- (10) Novikov, L. N.; Novikova, L. N.; Mosahebi, A.; Wiberg, M.; Terenghi, G.; Kellerth, J. O. *Biomaterials* **2002**, 23, 3369.
- (11) Khanna, S.; Srivastava, A. K. *Process Biochemistry* **2005**, 40, 607.
- (12) Wang, Y. W.; Wu, Q.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2004**, 25, 669.
- (13) Yang, X.; Zhao, K.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2002**, 23, 1391.
- (14) Wang, Y. W.; Wu, Q.; Chen, J.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2005**, 26, 899.
- (15) DF, W. *Definitions in Biomaterials*; Elsevier: New York, 1987.
- (16) Kokubo, T.; Takadama, H. *Biomaterials* **2006**, 27, 2907.
- (17) Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. *Journal of Biomedical Materials Research* **1990**, 24, 721.
- (18) Ducheyne, P. *Journal of Biomedical Materials Research* **1987**, 21, 219.
- (19) Hench, L. L. *Journal of the American Ceramic Society* **1998**, 81, 1705.
- (20) Rahaman, M. N.; Day, D. E.; Sonny Bal, B.; Fu, Q.; Jung, S. B.; Bonewald, L. F.; Tomsia, A. P. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, 2355.
- (21) Rohanová, D.; Boccaccini, A. R.; Yunos, D. M.; Horkavcová, D.; Březovská, I.; Helebrant, A. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, 2623.
- (22) Ducheyne, P.; Qiu, Q. *Biomaterials* **1999**, 20, 2287.
- (23) Boccaccini, A. R.; Maquet, V. *Composites Science and Technology* **2003**, 63, 2417.
- (24) Lu, H. H.; Tang, A.; Oh, S. C.; Spalazzi, J. P.; Dionisio, K. *Biomaterials* **2005**, 26, 6323.
- (25) Khademhosseini, A.; Langer, R.; Borenstein, J.; Vacanti, J. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 2480.
- (26) Roether, J. A.; Boccaccini, A. R.; Hench, L. L.; Maquet, V.; Gautier, S.; Jérôme, R. *Biomaterials* **2002**, 23, 3871.
- (27) Chan, C.; Thompson, I.; Robinson, P.; Wilson, J.; Hench, L. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **2002**, 31, 73.
- (28) Oliva, A.; Salerno, A.; Locardi, B.; Riccio, V.; Della Ragione, F.; Iardino, P.; Zappia, V. *Biomaterials* **1998**, 19, 1019.
- (29) Jamali, A.; Hilpert, A.; Debes, J.; Afshar, P.; Rahban, S.; Holmes, R. *Calcified Tissue International* **2002**, 71, 172.
- (30) A, N. *Act Chir Scand* **1944**, 91, 17.
- (31) Peltier LF, L. R. *Surgical Forum* **1955**, 6, 556.
- (32) Walsh, W. R.; Morberg, P.; Yu, Y.; Yang, J. L.; Haggard, W.; Sheath, P. C.; Svehla, M.; Bruce, W. J. M. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **2003**, 228.
- (33) Lazáry, Á.; Balla, B.; Kósa, J. P.; Bácsi, K.; Nagy, Z.; Takács, I.; Varga, P. P.; Speer, G.; Lakatos, P. *Biomaterials* **2007**, 28, 393.
- (34) Podaropoulos L, V. A., Papadimitriou S, Alexandridis C, Kalyvas D. *Journal of Oral Implantology* **2009**, 35, 28.
- (35) Stubbs, D.; Deakin, M.; Chapman-Sheath, P.; Bruce, W.; Debes, J.; Gillies, R. M.; Walsh, W. R. *Biomaterials* **2004**, 25, 5037.

- (36) Damien, C. J.; Parsons, J. R. *Journal of applied biomaterials : an official journal of the Society for Biomaterials* **1991**, 2, 187.
- (37) Erdemli, O.; Çaptug, O.; Bilgili, H.; Orhan, D.; Tezcaner, A.; Keskin, D. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2010**, 21, 295.
- (38) Scandola, M.; Ceccorulli, G.; Pizzoli, M.; Gazzano, M. *Macromolecules* **1992**, 25, 1405.
- (39) Doi, Y.; Kitamura, S.; Abe, H. *Macromolecules* **1995**, 28, 4822.
- (40) Chen, L. J.; Wang, M. *Biomaterials* **2002**, 23, 2631.
- (41) Ding, C.; Cheng, B.; Wu, Q. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2010**, 1.
- (42) Pinto, A. J.; Jimenez, A.; Prieto, M. *Mineralogical Magazine* **2008**, 72, 277.
- (43) Hu, Y.; Zhang, J.; Sato, H.; Noda, I.; Ozaki, Y. *Polymer* **2007**, 48, 4777.
- (44) Asrar, J.; Valentin, H. E.; Berger, P. A.; Tran, M.; Padgett, S. R.; Garbow, J. R. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1006.
- (45) Misra, S. K.; Nazhat, S. N.; Valappil, S. P.; Moshrefi-Torbati, M.; Wood, R. J. K.; Roy, I.; Boccaccini, A. R. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 2112.
- (46) Sato, H.; Nakamura, M.; Padermshoke, A.; Yamaguchi, H.; Terauchi, H.; Ekgasit, S.; Noda, I.; Ozaki, Y. *Macromolecules* **2004**, 37, 3763.
- (47) van der Heijden, G. H. A.; Pel, L.; Huinink, H. P.; Kopinga, K. *Chemical Engineering Science* **2011**, 66, 4241.
- (48) Axenenko, O.; Thorpe, G. *Computational Materials Science* **1996**, 6, 281.
- (49) Wullschlegel, L.; Ghazi Wakili, K. *Fire and Materials* **2008**, 32, 103.
- (50) McAdie, H. G. *Analytical Chemistry* **1963**, 35, 1840.
- (51) Gao, Y.; Kong, L.; Zhang, L.; Gong, Y.; Chen, G.; Zhao, N.; Zhang, X. *European Polymer Journal* **2006**, 42, 764.
- (52) Shen, F.; Zhang, E.; Wei, Z. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, 73, 302.
- (53) Bluhm, T. L.; Hamer, G. K.; Marchessault, R. H.; Fyfe, C. A.; Veregin, R. P. *Macromolecules* **1986**, 19, 2871.
- (54) Bleach, N. C.; Nazhat, S. N.; Tanner, K. E.; Kellomäki, M.; Törmälä, P. *Biomaterials* **2002**, 23, 1579.
- (55) Nazhat, S. N.; Kellomäki, M.; Törmälä, P.; Tanner, K. E.; Bonfield, W. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, 58, 335.
- (56) Lim, J. Y.; Shaughnessy, M. C.; Zhou, Z.; Noh, H.; Vogler, E. A.; Donahue, H. J. *Biomaterials* **2008**, 29, 1776.
- (57) Vogler, E. A. *Advances in Colloid and Interface Science* **1998**, 74, 69.
- (58) Wilda, H.; Gough, J. E. *Biomaterials* **2006**, 27, 5220.
- (59) Murakami, R.; Sato, H.; Dybal, J.; Iwata, T.; Ozaki, Y. *Polymer* **2007**, 48, 2672.
- (60) Sato, H.; Dybal, J.; Murakami, R.; Noda, I.; Ozaki, Y. *Journal of Molecular Structure* **2005**, 744-747, 35.
- (61) Misra, S. K.; Ansari, T.; Mohn, D.; Valappil, S. P.; Brunner, T. J.; Stark, W. J.; Roy, I.; Knowles, J. C.; Sibbons, P. D.; Jones, E. V.; Boccaccini, A. R.; Salih, V. *Journal of the Royal Society Interface* **2010**, 7, 453.
- (62) Oonishi, H.; Hench, L. L.; Wilson, J.; Sugihara, F.; Tsuji, E.; Matsuura, M.; Kin, S.; Yamamoto, T.; Mizokawa, S. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 51, 37.
- (63) Fujishiro, Y.; Hench, L. L.; Oonishi, H. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1997**, 8, 649.
- (64) Roether, J. A.; Gough, J. E.; Boccaccini, A. R.; Hench, L. L.; Maquet, V.; Jérôme, R. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2002**, 13, 1207.
- (65) Notingher, I.; Boccaccini, A. R.; Jones, J.; Maquet, V.; Hench, L. L. *Materials Characterization* **2002**, 49, 255.
- (66) Shangguan, Y. Y.; Wang, Y. W.; Wu, Q.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2006**, 27, 2349.
- (67) Wang, Y. W.; Wu, Q.; Chen, G. Q. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 566.
- (68) Li, X. T.; Sun, J.; Chen, S.; Chen, G. Q. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2008**, 87, 832.

José M^{el}. García G.

(69) Yang, H. X.; Sun, M.; Zhou, P. *Polymer* **2009**, *50*, 1533.



V-COMPOSITES SEMICONDUCTORES PARA TERAPIAS REGENERATIVAS

Tres tipos diferentes de nanotubos de carbono se han empleado para obtener composites semiconductores con P3HB3HHx. Las propiedades físico-químicas se han evaluado exhaustivamente. La citotoxicidad de los materiales desarrollados se ha estudiado en una primera aproximación empleando células neuronales.

V-1. INTRODUCCIÓN

V-1.1. COMPOSITES SEMICONDUCTORES PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Materiales compuestos o composites (mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos) y polímeros semiconductores han demostrado poseer grandes ventajas como sustratos para la ingeniería de tejidos. Esto se debe a que numerosas líneas celulares, neuronas, osteoblastos, fibroblastos y miofiblastos responden a estímulos eléctricos. El empleo de composites semiconductores puede facilitar la estimulación eléctrica de las células en un medio con propiedades mecánicas adecuadas. Este material híbrido podría facilitar la comunicación eléctrica y mecánica de las células en el nuevo tejido formado, proporcionando la integración del material empleado para la reconstrucción o regeneración tisular en el entorno receptor.¹

En trabajos previos se ha demostrado que las cargas eléctricas juegan un papel importante en la estimulación o proliferación de varios tipos de células.² Se ha comprobado, por ejemplo, que es posible mejorar el crecimiento neuronal con polímeros semiconductores como el fluoruro de vinidileno,^{3,4} politetrafluoroetileno polarizado⁵ y polipirrol oxidado.² En el caso del crecimiento neuronal, la mejora en el mismo se ha atribuido a la presencia de cargas en la superficie, que promovería la adhesión de estas células conductoras y facilitaría y potenciaría su proliferación.

Se pueden considerar dos grandes ventajas del uso de composites poliméricos semiconductores en aplicaciones de ingeniería de tejidos: En primer lugar, a diferencia de lo que ocurre con los campos electromagnéticos exógenos, la estimulación eléctrica a través de los materiales composites o polímeros semiconductores se focaliza predominantemente en la zona que rodea al material, permitiendo un control espacial de la estimulación. Y en segundo lugar, la posibilidad de modificar los composites superficialmente. Esta modificación permitiría la incorporación de factores de crecimiento o receptores específicos para los distintos tejidos, incrementando de este modo las ventajas que presenta la estimulación eléctrica en el crecimiento tisular.

V-1.1.1 COMPOSITES SEMICONDUCTORES PARA REGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO

En muchos casos el sistema nervioso central no puede regenerarse y recuperar su funcionalidad tras un trauma o una enfermedad.⁶⁻⁸ Además, las lesiones en la médula espinal normalmente producen parálisis permanente de las funciones motoras y pérdida de sensibilidad por debajo de la zona de la médula espinal dañada, debido a la imposibilidad de la médula espinal adulta de regenerarse tras una lesión.⁹ De igual modo, las lesiones en el sistema nervioso periférico son muy comunes y de modo habitual conducen a una discapacidad permanente.¹⁰⁻¹³ Cuando se produce un daño en el sistema nervioso adulto, es difícil llevar a cabo una regeneración del mismo, especialmente cuando el defecto es muy grande.^{10,12}

Actualmente las terapias quirúrgicas para la reconstrucción del sistema nervioso periférico están basadas todavía en el uso de injertos de nervio del propio paciente. Pero esta aproximación tiene una gran cantidad de desventajas, incluyendo el complicado proceso quirúrgico, la pérdida de función nerviosa en la zona donante y el límite en la cantidad de nervio disponible, entre muchas otras.^{10,13} El uso de materiales biodegradables y biocompatibles para reparar o regenerar nervios supone un gran avance, pues elimina la necesidad de más de una intervención quirúrgica y no está limitado por la disponibilidad de tejido nervioso, presentando un futuro prometedor.

Si bien no se conocen perfectamente los mecanismos y factores que hacen que la estimulación eléctrica mejore la regeneración nerviosa, se han sugerido numerosas teorías para explicar este efecto, entre las que se incluyen:²

- i) La redistribución electroforética de los factores de crecimiento de la membrana celular y receptores de la adhesión o proteínas citoesqueléticas como la actina, todos los cuales intervienen en los procesos de crecimiento.
- ii) El favorecimiento de cambios en la membrana o en la conformación de proteínas de la matriz extracelular.
- iii) La polarización directa o hiperpolarización de los nervios.
- iv) La mejora de la síntesis de proteínas en el organismo.

- v) La inducción por el campo eléctrico de gradientes de iones y moléculas en el medio de cultivo o en el medio líquido de los tejidos.

Con todo ello, el desarrollo de biomateriales semiconductores (o conductores) para la regeneración del sistema nervioso, representa un amplio e interesante campo de estudio.

V-1.2. EMPLEO DE NANOTUBOS DE CARBONO PARA LA OBTENCIÓN DE COMPOSITES SEMICONDUCTORES

El descubrimiento de los nanotubos de carbono (CNTs, del inglés Carbon Nanotubes) por Ijima¹⁴ ha supuesto un desarrollo rápido de la nanotecnología basada en el carbono como plataforma para una gran variedad de usos, incluyendo las aplicaciones biomédicas.

Los CNTs son tubos cilíndricos con diámetro nanométrico y longitudes mucho mayores (> 100 nm), lo que les confiere un gran ratio de aspecto. Poseen una gran variedad de propiedades electrónicas, térmicas y estructurales, definidas por el diámetro, longitud, y quiralidad o torsión. Los nanotubos de carbono pueden poseer una única pared, denominados en este caso como nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs, del inglés Single Wall Carbon Nanotubes), o estar formados por cilindros concéntricos de carbono, normalmente conocidos como nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs, del inglés Multi Wall Carbon Nanotubes).¹⁵

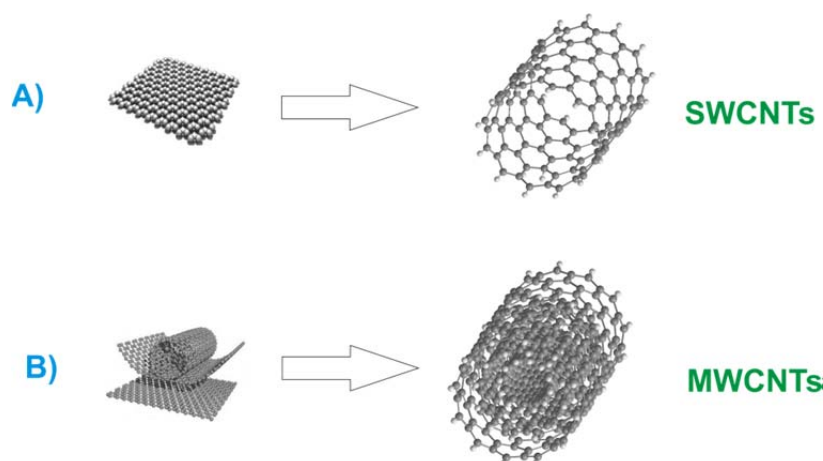


Figura V-1: A) nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) y B) nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs)

Los métodos de obtención de los nanotubos de carbono incluyen de modo general tres vías preparativas: arco de descarga,¹⁶ ablación láser,¹⁷ y deposición química de vapor,¹⁸ que es el método más ampliamente empleado para la producción industrial de CNTs.

La obtención de nanotubos de carbono mediante el método de deposición química de vapor, normalmente incluye la utilización de un catalizador metálico y la deposición de depósitos carbonosos en el exterior del nanotubo. Dada la citotoxicidad de los catalizadores, se requiere de un proceso de purificación previo a la utilización de los CNTs en aplicaciones biomédicas.

Existen varios métodos de purificación de los nanotubos de carbono.¹⁹⁻²² El lavado a reflujo de los CNTs en un ácido oxidante como el ácido nítrico es el método de purificación más ampliamente utilizado. Este procedimiento consigue oxidar y quitar el catalizador metálico y los depósitos carbonosos de dentro y fuera del nanotubo. Además actúa reaccionando con los extremos del nanotubo y los defectos distribuidos a lo largo de las paredes del mismo, pudiendo dar lugar a la formación de grupos carboxílicos en la superficie del CNT.

Por otra parte, también la funcionalización de los nanotubos de carbono es una metodología bastante empleada ya que puede favorecer la interacción con la matriz polimérica, permitiendo una mejor dispersión de los CNTs e influyendo positivamente en la homogeneidad de las propiedades del composite, incluida la conductividad eléctrica.

V-1.2.1. USO DE NANOTUBOS DE CARBONO PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

En el campo de la ingeniería de tejidos, hay cuatro áreas en las que se emplean los nanotubos de carbono: (i) marcado y seguimiento de células, (ii) detección del comportamiento celular, (iii) potenciación del comportamiento celular y (iv) modificando las características de las matrices usadas en ingeniería de tejidos.

La posibilidad del seguimiento de las células implantadas, y la monitorización del progreso de formación del nuevo tejido *in vivo* de modo no invasivo, es importante

en ingeniería de tejidos, presentando los nanotubos de carbono las capacidades necesarias para ser usados en este fin.

Si el seguimiento celular puede aportar información vital para el conocimiento de la migración celular, la detección del comportamiento celular facilitaría la obtención de más conocimiento sobre la biología celular necesario para la ingeniería tisular. Nanosensores contruidos de nanotubos de carbono podrían ser usados en el seguimiento continuo del rendimiento celular, a través del conocimiento de la fisiología celular, el transporte iónico, etc.

El uso de nanotubos de carbono para cesión controlada de fármacos²³ o transfección,²⁴ puede influir directamente en el comportamiento celular, modulando la respuesta celular en los distintos procesos acaecidos durante las terapias de regeneración tisular.

El sustrato o soporte celular desempeña un papel primordial en la ingeniería de tejidos, ya que define el espacio de la intervención y favorece el proceso de regeneración, presentando las adecuadas características y manteniendo su integridad física y mecánica durante el tiempo necesario. El empleo de nanotubos de carbono se ha mostrado efectivo en la mejora de las propiedades deficientes del PLGA y PLA para su uso en ingeniería de tejidos.¹⁵ Los nanotubos de carbono pueden ser fácilmente funcionalizados, lo que permite incluir nuevos grupos funcionales en las matrices poliméricas. Todos estos factores se unen a la conductividad eléctrica de los nanotubos de carbono, que puede ser empleada para la obtención de un composite semiconductor que implemente el crecimiento celular en los biopolímeros.

V-1.2.2. EMPLEO DE NANOTUBOS DE CARBONO EN TERAPIAS REGENERATIVAS DEL SISTEMA NERVIOSO

Los desórdenes en el sistema nervioso central y periférico incluyen las enfermedades neurodegenerativas y los tumores cerebrales. La particularidad del entorno y las restricciones anatómicas de acceso (la barrera hematoencefálica del cerebro) al sistema nervioso central complican el tratamiento y diagnóstico de los desórdenes o enfermedades del sistema nervioso central. Gracias a las minúsculas dimensiones y la posibilidad de ser modificados interna o externamente, los

nanomateriales son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica pudiendo actuar como vehículos para la cesión de vectores y fármacos en el cerebro.

Algunos estudios han determinado que la carga de los nanotubos se puede manipular para controlar el crecimiento de neuronas,²⁵ y que los CNTs funcionalizados con factores de crecimiento de los nervios o neurotrópicos derivados del cerebro, podrían estimular el crecimiento de neuronas en los sustratos de nanotubos.²⁶

V-1.2.3. TOXICIDAD DE LOS NANOTUBOS DE CARBONO

Por muy prometedora que una nueva tecnología o material pueda ser para aplicaciones biomédicas, esta debe ser segura. Cada vez que una sustancia extraña entra en el organismo, el entendimiento y conocimiento de la respuesta del cuerpo es esencial.

Algunos estudios han indicado que los nanotubos de carbono pueden ser tóxicos mientras que otros, tal y como se ha apuntado con anterioridad, han demostrado que son excelentes sustratos para el crecimiento celular, con especial importancia en el caso de las células del sistema nervioso.²⁵

Al mismo tiempo que se desarrollan nuevas aplicaciones biomédicas para los nanotubos de carbono, la citotoxicidad de los mismos se puede reducir mediante su funcionalización química superficial.²⁷ Sin embargo, pueden existir algunas limitaciones para el uso de este nanomaterial ya que no es biodegradable¹⁵ y podría acumularse en los pulmones o bronquios cuando está aglomerado.²⁸ Pero por otro lado, la preparación de biocomposites con nanotubos de carbono como carga evita el contacto directo de las células con los CNTs, previniendo los posibles efectos citotóxicos que pueden tener los nanotubos de carbono en las células. El normal devenir del proceso de degradación a lo largo de la vida útil del biomaterial, proporciona una cesión lenta de los nanotubos de carbono a la matriz extracelular sin que se produzca su acumulación, lo que permite la rápida eliminación de los CNTs del cuerpo²⁹ a través de la ruta de excreción renal.³⁰

Con todo ello, la funcionalización superficial de los nanotubos de carbono permite la disminución de su citotoxicidad, así como la mejor interacción con la matriz polimérica, disminuyendo la formación de aglomerados durante el proceso de formación del composite. Por tanto, la funcionalización superficial y correcta dispersión

de los nanotubos de carbono en la matriz polimérica, pueden representar estrategias adecuadas para la utilización de los CNTs en la obtención de composites a emplear en la ingeniería tisular.

V-1.3. APLICACIÓN DE COMPOSITES SEMICONDUCTORES DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-*co*-3-HIDROXYHEXANOATO) COPOLÍMERO PARA LA REGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO

Debido al gran avance de la ingeniería de tejidos, se están desarrollando numerosos métodos que hacen uso de materiales semiconductores biodegradables para la reconstrucción de defectos en los nervios.³¹ En los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para fabricar conductos nerviosos sintéticos, y se han estudiado distintos biomateriales, como PGA,³² PLGA,^{33,34} P3HB,^{35,36} gelatina,³⁷⁻³⁹ colágeno,^{13,33,40-42} quitosano^{10,32,43-45} y seda.^{46,47} Todavía es de gran interés la búsqueda de nuevos materiales con propiedades más favorables y métodos de procesamiento más flexibles.⁴⁷

Es conocido que un conducto biodegradable ideal debería compaginar sus propiedades para mantener su integridad estructural y permitir la comunicación entre células y el posterior crecimiento de tejido durante el proceso regenerativo.^{48,49} Para conseguir esto es necesario que el material tenga propiedades mecánicas, capacidad de procesamiento amplia y sea biocompatible.^{50,51}

Se ha demostrado que el P3HB3HHx muestra una alta biocompatibilidad con una gran cantidad de líneas celulares, incluyendo fibroblastos,⁵² células del músculo liso,⁵³ condrocitos derivados del cartílago articular de conejo,^{54,55} osteoblastos,⁵⁶ y células de la médula ósea.⁶ Dadas sus mejores propiedades mecánicas en comparación con el P3HB, el P3HB3HHx se ha empleado satisfactoriamente para ingeniería tisular de conductos nerviosos.^{35,36} Estudios previos demuestran, además, la no toxicidad de los productos de degradación del P3HB3HHx.^{50,51,57-59}

Bian et al.⁶⁰ emplearon copolímeros de P3HB3HHx para fabricar conductos nerviosos artificiales no tóxicos, con buena regeneración nerviosa, y adecuadas propiedades mecánicas. Su trabajo demostró que los nervios artificiales contruidos con P3HB3HHx son capaces de reparar daños en el sistema nervioso periférico.

En comparación con otros PHAs y con el PLA, las películas de P3HB3HHx muestran una mejor viabilidad para la adhesión y proliferación de células del sistema nervioso,⁹ ya que las películas de P3HB3HHx poseen una rugosidad, topología e hidrofobicidad más idóneas, lo que podría explicar los resultados tan prometedores encontrados. Estos resultados son concordantes con resultados previos que demuestran una mejor viabilidad de los sustratos de P3HB3HHx para el crecimiento de varias líneas celulares.^{6,9,56}

La introducción de CNTs químicamente modificados con diversos vectores en una matriz biopolimérica permitiría obtener un material compuesto que, tras ser injertado en la zona a tratar, cediera de modo controlado los nanotubos de carbono. Así, sería posible la aplicación de un tratamiento localizado y sin intervención externa en zonas del sistema nervioso central o periférico de difícil acceso. La aplicación de un campo eléctrico externo permitiría igualmente regular la cesión y la respuesta de los nanotubos de carbono frente al crecimiento neuronal, tal y como han demostrado numerosos estudios. Una matriz ideal para este procedimiento sería la formada por P3HB3HHx, cuya biocompatibilidad en el crecimiento celular y, neuronal en concreto, se ha demostrado superior al resto de PHAs y biopolímeros habitualmente empleados en ingeniería tisular (PLA, PLLA, PLGA).

En el presente capítulo se describe la preparación de bionanocomposites semiconductores, para potenciar el crecimiento del tejido nervioso, empleando P3HB3HHx como matriz polimérica y tres tipos diferentes de CNTs como nanocargas. Se prepararon materiales compuestos con 0.3, 0.6 y 1.2 % de CNTs, y se estudió el efecto de la cantidad de carga en sus propiedades físico-químicas. Como control se emplearon CNTs purificados sin tratamiento químico superficial. Con el propósito de mejorar la interacción matriz-carga, los nanotubos de carbono se oxidaron superficialmente introduciendo grupos funcionales ácido y alcohol en los defectos superficiales de los nanotubos. Considerando que la naturaleza superficial de los nanotubos de carbono es un factor fundamental en la obtención de composites con propiedades idóneas, tanto mecánicas como térmicas o conductoras, se modificó la superficie de nanotubos de carbono con P3HB3HHx. Esta funcionalización dirigida a mejorar la interacción con la matriz polimérica, se realizó mediante una reacción de

Diels-Alder empleando P3HB3HHx de bajo peso molecular funcionalizado con furfurilamina en uno de los extremos de cadena.

De este modo, el trabajo propuesto permitió analizar la influencia de la cantidad y el tipo de nanocarga empleado en las propiedades físico-químicas de los composites, que fueron evaluadas ampliamente. Los resultados obtenidos facilitaron el establecimiento de las pautas necesarias para elegir el mejor biocomposite que, posteriormente, se empleó en estudios de citocompatibilidad con neuroesferas.

V-2. MATERIALES Y MÉTODOS

V-2.1. MATERIALES

Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)(P3HB3HHx)

El copolímero de origen natural poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato), con una fracción molar de 3-hidroxihexanoato igual al 14 % ($\bar{M}_w = 102000 \text{ g mol}^{-1}$), fue proporcionado por el Profesor Chen GQ, de la Universidad de Tsinghua.

Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple (MWCNTs, del inglés Multi Wall Carbon Nanotubes)

Los CNTs fueron suministrados por la Dra. María del Mar Bernal Ortega (Instituto de Ciencia y Tecnología de polímeros, ICTP-CSIC, Madrid, España) y se sintetizaron mediante el método de deposición química de vapor. Para la obtención de los nanotubos se inyectó una mezcla gaseosa de ferroceno (Aldrich 98 %)/tolueno (3 % en peso de ferroceno en tolueno) en un horno tubular a 760 °C con un flujo constante de 5 mL h⁻¹, bajo atmósfera inerte de nitrógeno (325 mL min⁻¹).^{61,62}

Reactivos

La furfurilamina empleada en el proceso de funcionalización de los extremos de cadena del P3HB3HHx de bajo peso molecular, fue proporcionada por Sigma-Aldrich (pureza $\geq 99\%$), se utilizó sin purificación previa.

La carbodiimida (EDC) ($\geq 97 \%$, Sigma-Aldrich) empleada para la activación del fragmento polimérico después de la degradación térmica durante la modificación

con furfurilamina, fue suministrada por Sigma-Aldrich. Para llevar a cabo la reacción la carbodiimida se empleó sin purificación previa.

Se empleó NHS (98 %) para la estabilización del polímero tras la degradación térmica y activación con EDC. Esta succinimida estabiliza el intermedio de reacción polimérico de modo previo al injerto de la furfurilamina. La NHS fue adquirida en Sigma-Aldrich y fue usada sin purificación previa.

Disolventes

Los disolventes empleados en los distintos procesos descritos en este capítulo fueron: cloroformo (99.95 %, SDS) y diclorometano (≥ 99.5 %, Sigma-Aldrich) para la disolución del polímero durante la obtención de los composites y la degradación térmica del mismo. Hexano (≥ 99 %, Lab scan) fue empleado para la precipitación del polímero después de la degradación térmica. Todos los disolventes fueron utilizados sin purificación previa.

Los ácidos utilizados en la obtención y tratamiento de los MWCNTs fueron HCl (37 %) empleado para su purificación y H₂SO₄ (95-98 %) en la reacción de oxidación, ambos suministrados por Panreac (Barcelona, España). El HNO₃ (≥ 99.5 %) empleado en la oxidación de los MWCNTs fue suministrado por Fluka y el tolueno utilizado en la reacción de funcionalización con PHDN lo fue por Merck.

El CHCl₃ deuterado (CDCl₃) empleado como disolvente para los análisis de RMN, con una pureza de 99.8 % fue suministrado por Aldrich.

El agua desionizada se obtuvo de un equipo Millipore Direct-Q 5. Este equipo proporciona agua de alta pureza mediante un sistema combinado de un filtro de partículas de carbón activo (0,22 μ m diámetro) y ósmosis inversa.

V-2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Degradación Térmica del Copolímero P3HB3HHx: Obtención de PHDN

Con el propósito de reducir el peso molecular del polímero aumentando el número de extremos de cadena accesibles a la reacción con furfurilamina, se llevó a cabo una degradación térmica en atmósfera de nitrógeno (N₂). Para ello, en un procedimiento estándar, 1 g de P3HB3HHx se introdujo en un reactor semicircular

estanco con un agitador magnético. Para obtener una atmósfera de reacción inerte y evitar la combustión del polímero durante la degradación, el reactor se purgó con N_2 ultrapuro durante 30 minutos antes del inicio de la reacción. A continuación, se introdujo el reactor en un baño de aceite a $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ ⁶³ con agitación magnética, durante 7 h, en atmósfera inerte. El esquema del proceso de degradación se muestra en la Figura V-2:

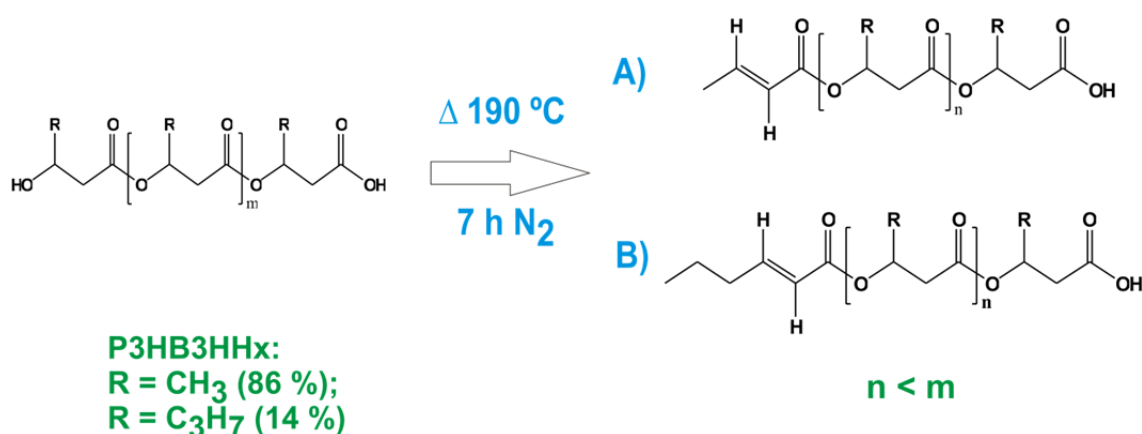


Figura V-2: Representación de la reacción de degradación térmica del copolímero P3HB3HHx en atmósfera de nitrógeno a $190\text{ }^{\circ}\text{C}$. A) extremo final 3HB. B) extremo final 3HHx.

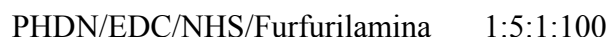
Trascurrido un tiempo de reacción determinado, el reactor se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, manteniéndose la atmósfera inerte. El polímero (denominado PHDN) se disolvió en diclorometano y se precipitó en hexano. Se secó a vacío hasta peso constante, obteniéndose un rendimiento del 90 %. El polímero se almacenó a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Funcionalización de Extremos de Cadena del P3HB3HHx de Bajo Peso Molecular (PHDN) con Furfurilamina: Obtención de PHDNF.

El extremo ácido del PHDN obtenido tras la degradación térmica del copolímero P3HB3HHx se funcionalizó con furfurilamina mediante una reacción de amidación. Este extremo reactivo se empleó para la posterior funcionalización superficial de nanotubos de carbono.

En un procedimiento estándar, 1.5 g de PHDN se disolvieron en 50 mL de CH_2Cl_2 en un matraz con agitación magnética a temperatura ambiente durante 2 h. Una vez disuelto completamente el polímero, se añadieron a la disolución en este orden,

0.184 g de EDC, 0.042 g de NHS y 1.861 g de furfurilamina. La relación molar de los reactivos fue:



Se empleó un exceso de furfurilamina con el fin de conseguir la funcionalización completa del polímero. La disolución se mantuvo en agitación durante 36 h en matraz cerrado, para asegurar la reacción de todos los extremos ácidos. A continuación, se disminuyó el volumen de disolvente mediante rotaevaporación y se precipitó el polímero (denominado PHDNF) en agua desionizada, eliminando de este modo los reactivos empleados solubles en agua. El polímero se lavó con abundante agua desionizada durante 24 h, con agitación magnética, renovándose el agua cada 8 horas. El esquema general del proceso de reacción es el mostrado en la Figura V-3:

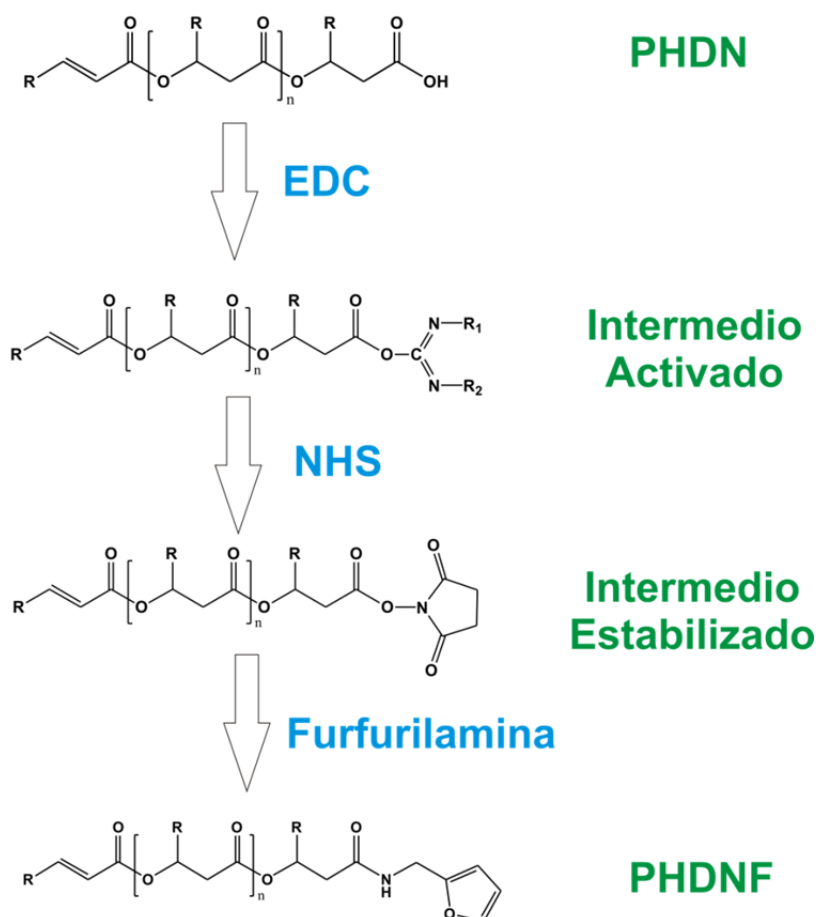


Figura V-3: Esquema del proceso de modificación de PHDN con furfurilamina.

A continuación, el polímero se filtró con placa filtrante lavándolo con abundante agua desionizada y se secó a vacío hasta peso constante. El polímero PHDNF se almacenó a -18 °C hasta su uso posterior.

Purificación de los Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple

Los CNTs fueron purificados con una disolución de HCl (37 %) y sonicando la disolución durante 30 minutos con una punta de ultrasonidos (Sonics VibraCell), en un baño de agua-hielo, para minimizar el aumento de temperatura de la disolución. A continuación, los MWCNTs se trataron de nuevo en una disolución de HCl durante 48 h con agitación, con el fin de eliminar todas las partículas metálicas.⁶⁴ Tras ello, la mezcla obtenida se filtró con una membrana filtrante hidrofóbica de PTFE, tamaño de poro 0.2 µm, y se lavó con agua destilada hasta pH neutro de las aguas de lavado, obteniéndose los CNTs purificados (pur-MWCNTs).

Oxidación de los Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple

Los MWCNTs sintetizados se trataron químicamente con una disolución concentrada de ácido sulfúrico/ácido nítrico (3:1), a reflujo a 120 °C durante 30 min. Después del tratamiento químico, la suspensión se filtró a través de un embudo de vidrio usando una membrana de PTFE (tamaño de poro 0.2 µm) y se lavó con abundante agua desionizada hasta pH neutro de las aguas de lavado. Mediante este procedimiento se obtuvieron nanotubos de carbono oxidados (oxi-MWCNTs), con grupos alcohol y ácido carboxílico en las paredes laterales del MWCNTs.^{62,65}

Funcionalización con P3HB3HHx de bajo peso molecular (PHDNF) de los Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple

La funcionalización de los MWCNTs purificados se realizó mediante reacción de Diels-Alder con PHDNF, donde los pur-MWCNTs actúan como reactivo dienófilo. En un matraz de 50 mL se suspendieron 50 mg de pur-MWCNTs en 20 mL de tolueno, y la mezcla se agitó durante 1 h a 50 °C. A continuación, se añadieron a la suspensión 0.480 mg de PHDNF y la mezcla fue purgada con argón durante 30 min. Para producir la reacción, el matraz se introdujo en un baño de silicona a 70 °C durante 48 h bajo agitación a 800 rpm. Tras el tiempo de reacción, los MWCNTs funcionalizados (fun-MWCNTs) se filtraron con membrana filtrante de PTFE hidrofóbica de tamaño de poro

0.2 μm y se lavaron con tetrahidrofurano, secándose a 50 °C. Los pur-MWCNTs se almacenaron en un recipiente cerrado hasta su uso, para evitar la absorción de humedad.⁶⁶

Preparación de Composites Conductores

Para la obtención de los composites conductores se emplearon tres tipos distintos de nanotubos de carbono; purificados (pur-MWCNTs), oxidados (oxi-MWCNTs) y funcionalizados con PHDNF (fun-MWCNTs). La Figura V-4 muestra un esquema de los diferentes CNTs empleados en la obtención de los composites.

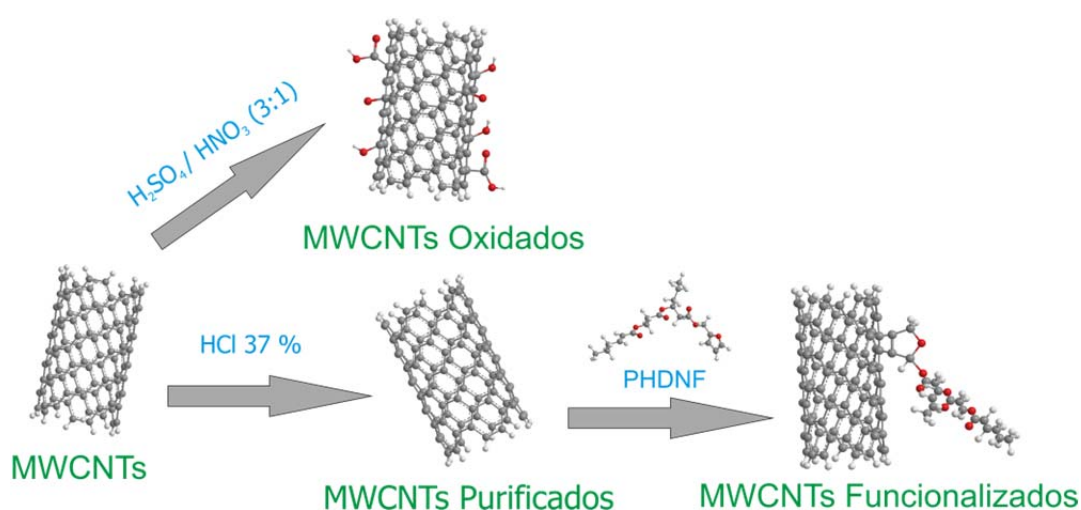


Figura V-4: Esquema de los tipos de CNTs empleados en la obtención de los composites, con las condiciones experimentales empleadas en su obtención.

Todos los composites de P3HB3HHx y nanotubos de carbono se prepararon por el método de colada. Se disolvió el P3HB3HHx (0.3667 g) en cloroformo (9 mL) bajo agitación suave y calentamiento en placa calefactora a 50 °C durante 4 h. Estas condiciones de calentamiento no producen alteración o degradación del polímero, pero permiten la dilución del mismo en el disolvente, facilitando, de este modo, su procesado. La cantidad de polímero en la disolución se determinó en función del espesor deseado para la película (100 μm), considerando como densidad del polímero 1,232 g cm^{-3} .⁶⁷

Después de alcanzar la disolución completa del polímero, se añadió la cantidad deseada de nanotubos de carbono, y se agitó la dispersión magnéticamente durante 2 h, manteniendo la temperatura a 50 °C. Se emplearon tres porcentajes en peso de

nanotubos de carbono, 0.3 %, 0.6 % y 1.2 %, añadiéndose respectivamente 0.0011 g, 0.0022 g y 0.0044 g de nanotubos de carbono.

Finalizada la suspensión de los nanotubos, se aplicó una punta de ultrasonidos (US) (Sonics vibra-cell, 500 W) para dispersar los nanotubos en la disolución del polímero. Se introduce el matraz de reacción en un baño de agua-hielo, evitando la evaporación del disolvente como consecuencia del calentamiento de la disolución por la aplicación de ultrasonidos. Se programó la punta de US en ciclos de 10 s de pulso encendido y 30 s de pulso apagado, evitando de este modo el calentamiento de la punta, y se aplicó US durante 35 min, con un 30 % de potencia.

Después de la dispersión de los nanotubos de carbono, se concentró la disolución hasta 1/3 del volumen inicial (3 mL), mediante calentamiento suave (50-60 °C) y con agitación magnética moderada. Realizada la evaporación parcial del disolvente, la disolución restante se vertió sobre un molde de vidrio (5.5 × 4.5 cm) y se cubrió para reducir la velocidad de evaporación. Se dejó evaporar el disolvente durante 48 h a temperatura ambiente, eliminando el cloroformo residual, mediante secado a vacío, a temperatura ambiente, durante 3 h. En la Figura V-5 se muestra un esquema general del proceso de obtención de los composites conductores:

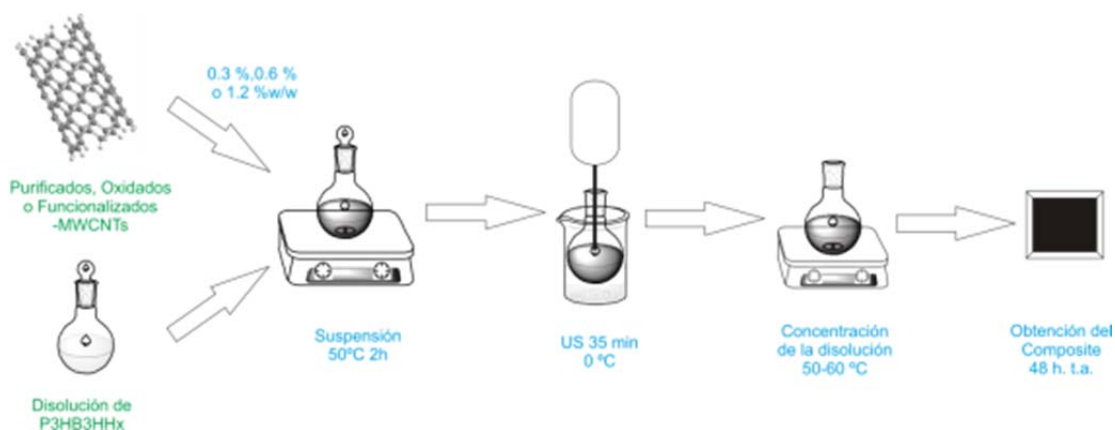


Figura V-5: Procedimiento general de obtención de composites semiconductores a partir de nanotubos de carbono y P3HB3HHx.

Resonancia Magnética Nuclear (NMR, del inglés Nuclear Magnetic Resonance)

El proceso de degradación térmica y modificación con furfurilamina del P3HB3HHx se siguió por resonancia magnética nuclear de protón (RMN de ^1H). Esta

técnica permitió determinar la presencia de los nuevos grupos funcionales formados como consecuencia de los procesos de modificación realizados al polímero.

El análisis estructural se hizo con un espectrómetro Varian Mercury, operando a 400 MHz, a temperatura ambiente. Entre 7-10 mg de muestra polimérica se disolvieron en CDCl₃. El desplazamiento químico de los protones residuales del disolvente ($\delta = 7.26$ ppm) se utilizó como referencia interna. Los espectros se adquirieron empleando pulso de 45°, tiempo de repetición de 1 s y 64 acumulaciones.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, del inglés Transmission Electron Microscopy)

El estudio de los MWCNTs con TEM se realizó en un equipo Zeiss LEO 910 de 120 kV con una cámara BIOSCAN 792 acoplada. Las muestras se prepararon a partir de suspensiones de CNTs en THF y posterior goteo sobre una rejilla de carbono. Las muestras fueron analizadas después de evaporar el disolvente a temperatura ambiente.

Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR, del inglés Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Los procesos de oxidación y funcionalización de los MWCNTs se estudiaron empleando FTIR. Para ello, los MWCNTs se mezclaron con KBr seco, homogeneizando la mezcla antes de obtener una pastilla. La pastilla se analizó en un espectrómetro Perkin-Elmer One FT-IR entre 4000-500 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹. Se estudió la variación en las bandas correspondientes a los nuevos grupos funcionales introducidos para determinar la modificación de los CNTs.

Espectroscopia Raman

Los MWCNTs presentan varias bandas características en los espectros Raman. La variación de la posición e intensidad relativa de dichas bandas, denominadas *D*, *G* y *G'*, se emplean de modo habitual en la evaluación de la modificación superficial de las paredes de este tipo de CNTs. Por ello, los CNTs se analizaron mediante espectroscopia Raman con un espectrómetro Renishaw Invia, empleando una longitud de onda de excitación de 514.5 nm y adquiriéndose el espectro entre 400-3200 cm⁻¹.

Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS, del inglés X-Ray Photoelectron Spectroscopy)

La XPS proporciona información útil para dilucidar la química superficial de los CNTs. Mediante el análisis en los espectros XPS de la relación de intensidades correspondientes a los distintos átomos observados (C y O), es posible determinar la variación en los grupos funcionales de los CNTs y, así, evaluar el proceso de oxidación y funcionalización llevado a cabo en los MWCNTs.

El estudio de los MWCNTs mediante XPS se realizó en un espectrómetro VG Escalab 200R, equipado con un analizador de electrones hemiesférico, trabajando con un paso de energía constante y un no-monocromador de radiación de rayos-X de Mg ($h\nu = 1253.36$ eV), a 10 mA y 12 kV. Los datos se analizaron mediante el programa *XPS peak*. La deconvolución de los espectros se realizó mediante un ajuste de mínimos cuadrados a una función compuesta Gauss-Lorentz después de la substracción de la línea base (función de Shirley). La energías de enlace se normalizaron utilizando el pico C_{1s} del carbono (284.8 eV) como estándar interno.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, del inglés Scanning Electron Microscopy)

La distribución e interacción de las cargas con la matriz polimérica desempeña un importante papel en la variación de las propiedades mecánicas y conductoras de los bionanocomposites. Por este motivo las muestras fueron observadas por SEM.

Las muestras fueron recubiertas con una capa de oro-paladio (80/20) de 10 nm de espesor y observadas en un microscopio electrónico de barrido Hitachi SU8000, trabajando a 1 kV, para evitar la degradación de las muestras durante la observación.

El estudio de un corte transversal de los composites permitió determinar la homogeneidad de la distribución de los nanotubos de carbono en la matriz polimérica. Con objeto de evaluar la interfaz carga-matriz, se obtuvieron imágenes de alta resolución para observar las posibles diferencias en la interacción polímero-CNT debidas a la distinta naturaleza superficial de los CNTs. Además, la observación de la superficie de las muestras permitió evaluar la migración de las cargas hacia la parte externa de los composites.

Análisis Termogravimétrico (TGA, del inglés ThermoGravimetric Analysis)

La influencia de los nanotubos de carbono en la matrices poliméricas produce en algunos casos un aumento de la temperatura de degradación del polímero, incrementando de este modo la estabilidad térmica del mismo. Por ello, se evaluó la estabilidad térmica de los composites mediante un analizador termogravimétrico TGA Q500 de TA Instruments (Waters).

Todos los composites, así como los nanotubos de carbono y el polímero empleado en su obtención, fueron sometidos al mismo tratamiento térmico. La variación de temperatura, desde temperatura ambiente hasta 800 °C, se realizó con una velocidad de calentamiento de 10 °C min⁻¹ y un flujo constante de aire de 10 mL min⁻¹.

La temperatura máxima de descomposición (T_{max}) fue determinada a partir de la primera derivada de la pérdida de peso.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, del inglés Differential Scanning Calorimetry)

Parte de las propiedades térmicas de los composites se evaluaron mediante calorimetría diferencial de barrido. La respuesta de los composites se caracterizó mediante el estudio de la temperatura de transición vítrea (T_g), las temperaturas de fusión (T_m) y las entalpías de fusión (ΔH_m) a partir de las endotermas de fusión.

Las muestras (8-11 mg) se analizaron en un DSC QA 100 de TA Instruments bajo corriente de 20 mL min⁻¹ de N₂. Cada muestra se analizó en un ciclo de tres barridos (calentamiento-enfriamiento-calentamiento) a 10 °C min⁻¹, en un intervalo de temperatura entre -40 y 190 °C. La respuesta en energía fue calibrada mediante la entalpía de fusión del zafiro y la escala de temperaturas se calibró a partir de los puntos de fusión del indio.

La T_g se estima como la temperatura donde la capacidad calorífica es intermedia ($\Delta C_p/2$) entre los valores correspondientes al estado vítreo y al estado elástico. Las T_m se estimaron a partir de los valores máximos de flujo de calor del primer barrido. La ΔH_m se determinó a partir del área bajo la curva de los picos de fusión correspondientes.

Microscopía Electrónica de Fuerza Atómica (AFM, del inglés Atomic Force Microscopy)

La rugosidad de la muestra es una característica importante en el desarrollo de materiales para aplicaciones biomédicas. Teniendo en cuenta que la superficie es la zona del material que interacciona directamente con las células y tejidos, su rugosidad juega un papel significativo en el proceso de adhesión, proliferación e incluso diferenciación celular.⁵²

Las posibles variaciones en la rugosidad superficial de los composites se evaluaron mediante microscopía electrónica de fuerza atómica con un equipo Veeco Bruker Multimode Atomic AFM. Se observó una superficie de $10\ \mu\text{m}^2$ mediante el método de contacto, obteniéndose imágenes en fase y en altura. Se empleó una punta de fósforo dopada con silicio y una velocidad de análisis de 0.5-0.6 Hz.

La rugosidad de las superficies se evaluó mediante las variables R_q (rugosidad rms o rugosidad cuadrática media, del inglés root mean square roughness), R_a (rugosidad media, del inglés average roughness) y R_{max} (rugosidad máxima, del inglés maximum roughness).

Medidas de Ángulo de Contacto (CA, del inglés Contact Angle)

La superficie del sustrato (en nuestro caso, material compuesto), así como sus propiedades interfaciales son de gran importancia en la biocompatibilidad del mismo. Por ello, el ángulo de contacto de las superficies de los composites se evaluó empleando la metodología descrita en el subapartado II-2.2.5. , “*Medidas de Ángulo de Contacto (CA, del inglés Contact Angle)*”, Capítulo II.

Ensayos de Esfuerzo-Deformación

A partir de los ensayos de esfuerzo-deformación se pueden determinar las propiedades mecánicas de una muestra, permitiendo, en nuestro caso, realizar un estudio de la influencia que la carga tiene en el comportamiento del polímero. La metodología empleada es la descrita en el Capítulo III, en Metodología Experimental. Se midieron tres muestras de cada tipo de composite, representando los resultados como la media de las tres medidas \pm la desviación estándar.

Medidas de Conductividad

La conductividad eléctrica es un fenómeno que indica el transporte de cargas en el interior de un material, transporte que genera una corriente eléctrica. A partir del conocimiento de que la corriente eléctrica, J , es proporcional al campo eléctrico aplicado, E , y empleando la ley de Ohm:

$$J = E \rho^{-1} = E \sigma \quad [1]$$

es posible determinar la resistividad o la conductividad eléctrica, ρ o σ . A diferencia de la dependencia existente entre la resistencia y la geometría de la muestra, la resistividad o conductividad eléctricas dependen de la naturaleza del material.

Mediante medidas de resistividad superficial o transversal es posible determinar si un material se puede considerar conductor cuando al aplicar una tensión continua a los electrodos en contacto con el material, se genera una corriente permanente que atraviesa el material o circula en su superficie. En función de los valores de conductividad eléctrica de los materiales a temperatura ambiente, es posible clasificarlos en tres tipos principalmente:

$$\text{Conductores} \Rightarrow \quad 1.6 \cdot 10^{-8} - 1.0 \cdot 10^{-6} (\Omega \text{ m})^{-1}$$

$$\text{Semiconductores} \Rightarrow \quad 1.0 \cdot 10^{-6} - 1.0 \cdot 10^{10} (\Omega \text{ m})^{-1}$$

$$\text{Aislantes} \Rightarrow \quad 1.0 \cdot 10^{12} - 1.0 \cdot 10^{18} (\Omega \text{ m})^{-1}$$

En el caso particular de los polímeros, la conductividad eléctrica puede verse afectada por diversos factores como son su estructura y composición química, aditivos e impurezas, tiempo y temperatura de medida y presencia de humedad. En este sentido, la adición de nanocargas conductoras a la matriz polimérica aislante, puede modificar las características conductoras del material, cambiando su comportamiento de aislante a conductor o semiconductor. Estas propiedades conductoras de los composites supondrían una característica adecuada para favorecer el cultivo celular y la formación de nuevos tejidos en las posibles aplicaciones biomédicas de dichos materiales.

Para evaluar el comportamiento eléctrico de los composites, la señal de respuesta a un estímulo sinusoidal fue analizada por transformada de Fourier mediante

el cálculo de la conductividad compleja. Para ello, discos de 2 cm de diámetro de cada muestra se midieron con un equipo Nobocontrol Broadband Dielectric. La respuesta de las muestras y del polímero sin cargas, empleando este como referencia, se midió a temperatura ambiente en el intervalo de frecuencias 10^{-1} - 10^7 Hz.

Ensayo de Citotoxicidad con Neuroesferas Fluorescentes

Todos los experimentos se realizaron siguiendo las directivas del Consejo de la Comisión Europea 86/609/CE y 2003/65/CE y las guías del Departamento de Salud de Estados Unidos de América para limitar el dolor y malestar de los animales de experimentación. Los ratones CFP son ratones C57 transgénicos para la proteína verde fluorescente (cepa C57BL/6-TgN(ACTbEGFP)10sb). Se emplearon células del cuerpo estriado de estos ratones para obtener las neuroesferas etiquetadas con la proteína fluorescente GFP.

Sembrado de neuroesferas de ratón GFP

El aislamiento de células del cuerpo estriado se realizó mediante disección y disociación mecánica de embriones de ratón E13 GFP. Estas células se incubaron en medio NB27 (Mezcla de medio Neurobasal y suplemento B27 (GIBCO, Escocia, Reino Unido) conteniendo bFGF humana (10 ng mL^{-1}) y EGF (20 ng mL^{-1} ; Peprotech, Nueva Jersey, Estados Unidos de América), L-glutamina (0.5 mM), L-glutamato (25 nM), penicilina (100 U mL^{-1}), estreptomycin (0.1 mg mL^{-1}) (todos adquiridos a Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), y fungizona (2.5 ng mL^{-1} ; Invitrogen, Madrid, España). Después de 7 días en este medio (denominado medio NB27), se recogieron las neuroesferas formadas que flotaban en el medio mediante centrifugación a velocidad baja y se lavaron para eliminar el glutamato con PBS y se centrifugaron de nuevo. Las células se disociaron mediante tripsinización y se pasaron empleando una aguja de 25-gauge, expandiéndose cada 3-4 días.

Cultivo celular de neuroesferas fluorescentes en los composites

Las dos muestras de sustratos de P3HB3HHx, sustratos sin CNTs empleado como referencia, y el sustrato con 1.2% de fun-MWCNTS (C-3-c) se esterilizaron mediante inmersión en disolución acuosa de etanol al 75 % en volumen. El etanol remanente se eliminó mediante lavado con disolución tampón de PBS y los sustratos se

transfirieron a placas de cultivo de 24 pocillos (Costar TM). Pocillos sin sustratos poliméricos y recubiertos con poli-L-Lisina (PLL) y sin recubrimiento se emplearon como controles positivos de la adhesión de neuroesferas. Para ello, 500 μ L de neuroesferas GFP suspendidas en medio NB27 más un 10 % de FBS (Lonza, Bruselas, Bélgica) se añadieron sobre las películas cuidadosamente. Para evitar cualquier desplazamiento de los sustratos que pudiera dar lugar a errores en el sembrado celular, las películas se sujetaron con anillos de teflón. La adhesión y proliferación de las neuroesferas GFP se analizó mediante microscopía (Leica DMI 600B) en lapsos de tiempo de 15 durante 48 h, empleando las señales de fluorescencia y contraste de fases.

Ensayo de MTT

La viabilidad celular se determinó mediante la metodología del ensayo de MTT descrito por Mei et al.⁶⁸ con ligeras modificaciones. Tras dos días de cultivo celular, los sustratos de P3HB3HHx con y sin fun-MWCNTs se lavaron con medio libre de suero para eliminar todas las posibles células muertas y no adheridas al sustratos y se transfirieron a otra placa de cultivo. Se añadieron a los sustratos 100 μ L de solución stock (0.5 mg mL⁻¹ en RPMI 1640), y se incubaron a 37 °C durante 4 h para propiciar la reacción con las células vivas, hasta la formación de MTT formazan. Después de las 4 h de incubación, los cristales de MTT formazan se disolvieron en 300 μ L de disolución de DMSO, tomando 200 μ L y transfiriéndolos a una placa de cultivo de 96 pocillos para ensayo de MTT. La densidad óptica (OD) de MTT formazan en DMSO se midieron con un medidor automático de placas de cultivo (Tecan, Ultra384), trabajando a una longitud de onda de 570 nm. Como referencia se empleó una disolución control con DMSO sin células. Se analizaron cuatro muestras de cada sustrato (y de las placas recubiertas y no con PLL empleadas como referencia) cada vez, dándose el resultado como la media \pm la desviación estándar.

Observación de la morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido

La morfología celular de las neuroesferas fluorescente, así como su distribución en los sustratos de P3HB3HHx, se observó mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello, se recubrieron las muestras con una capa de Au/Pd y se observaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi SU8000, trabajando a 1 kV y

temperatura ambiente, para evitar en la medida de lo posible la degradación de las muestras y las células. Se tomaron fotografías de las dos muestras, C-0 y C-3-c, en distintos puntos.

V-3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V-3.1. MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL DEL COPOLÍMERO P3HB3HHx

En el trabajo de investigación descrito en el presente capítulo se ha evaluado la influencia del tipo y cantidad de carga añadida a la matriz polimérica en las propiedades del composite resultante. A través de la modificación superficial de los nanotubos de carbono, se pretende mejorar la interacción matriz-carga, suponiendo que ello contribuirá a mejorar la homogeneidad de los composites. Se usaron tres tipos diferentes de nanotubos de carbono: purificados, oxidados superficialmente y funcionalizados con P3HB3HHx de bajo peso molecular.

Una de las estrategias seguidas para la mejora de la interacción es el injerto de fragmentos del polímero constituyente de la matriz polimérica (P3HB3HHx) en la superficie de los nanotubos de carbono. La modificación del polímero se llevó a cabo mediante degradación térmica, seguida de una funcionalización de los extremos con furfurilamina. En este apartado se describe la evaluación y discusión de los resultados obtenidos con esta modificación.

V-3.1.1. DEGRADACIÓN TÉRMICA DEL COPOLÍMERO P3HB3HHx: OBTENCIÓN DEL POLÍMERO PHDN.

El proceso de degradación térmica empleado permite la obtención de oligómeros bien definidos,⁶⁹ con un grupo insaturado en un extremo de cadena y un ácido carboxílico en el extremo opuesto. Este resultado es consecuencia de una reacción de cis-eliminación, debida a la labilidad del hidrógeno β de los ésteres carboxílicos de los poly(3-hidroxiálcanoatos).⁶⁹ El extremo insaturado, con la presencia de un doble enlace, variará en función del comonomero en el cual se produzca la rotura de cadena que conduce a la aparición de este extremo, tal y como se indica en la Figura V-2.

La Figura V-6 muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón del polímero P3HB3HHx, empleado como matriz polimérica para la formación de los composites y como material de partida para la funcionalización superficial de los nanotubos de carbono utilizados en la obtención de las muestras C-3, con la asignación de sus señales:

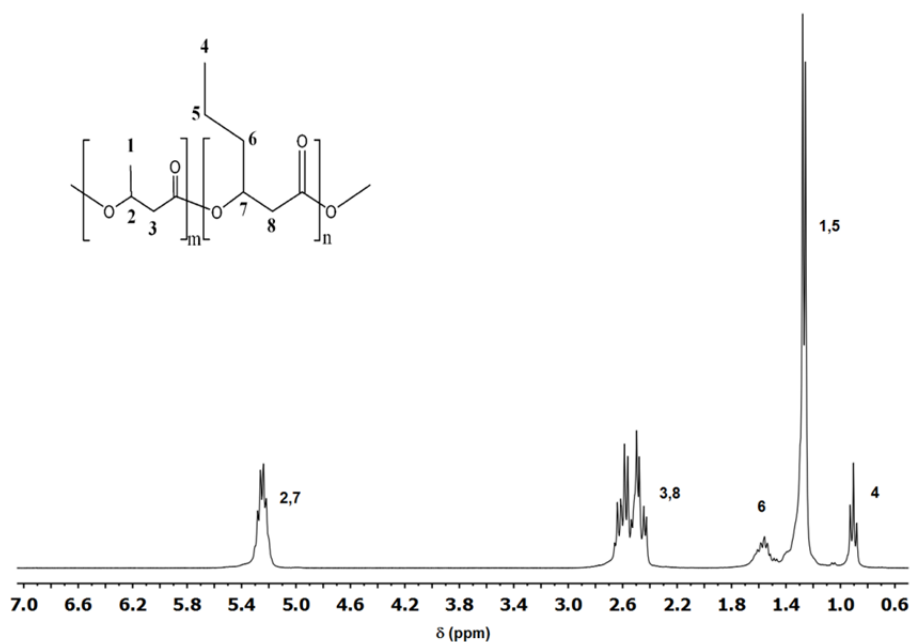


Figura V-6: Espectro de RMN de ^1H a temperatura ambiente del polímero P3HB3HHx y la asignación de sus señales.

En la Figura V-6 se observan las señales del 3HB a δ (ppm): señal 1 a 1.31 (d, -OCH(**CH**₃)CH₂CO₂-), señal 2 a 5.29 (m, -OCH(**CH**₃)-CH₂CO₂-) y señal 3 a 2.58 (m, -OCH(CH₃)**CH**₂CO₂-) y las correspondientes al 3HHx δ (ppm): señal 4 a 0.89 (t, -OCH(C₂H₄-**CH**₃)CH₂CO₂-), señal 5 a 1.31 (m, -OCH(CH₂-**CH**₂-CH₃)CH₂CO₂-), señal 6 a 1.55 (m, -OCH(**CH**₂-C₂H₅)CH₂CO₂-), señal 7 a 5.29 (m, -OCH(**C**₃H₇)-CH₂CO₂-) y señal 8 a 2.58 (m, -OCH(C₃H₇)**CH**₂CO₂-). Las señales son análogas a las determinadas en la literatura.⁶³

La aparición de las nuevas señales atribuibles al doble enlace presente en el polímero tras la degradación, se analizó mediante RMN de ^1H , y se empleó para el seguimiento del proceso. En la Figura V-7 se muestra el espectro de RMN de ^1H , con la asignación de las señales para el polímero obtenido, denominado PHDN:

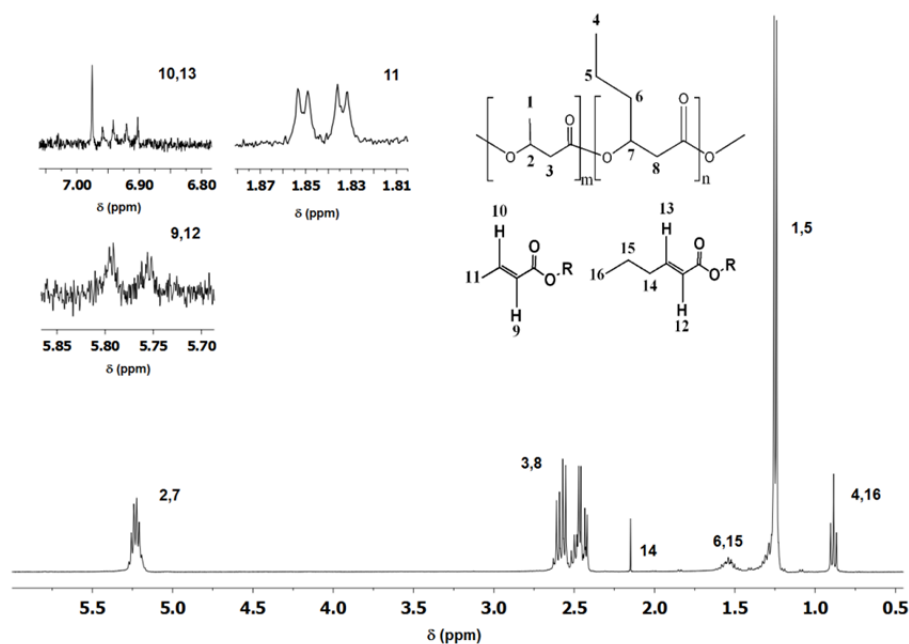


Figura V-7: Espectro de RMN de ^1H a temperatura ambiente del PHDN utilizado como material de partida para la funcionalización con furfurilamina, con la asignación de las señales.

Las nuevas señales observadas en el extremo insaturado del 3HB, como consecuencia de la degradación térmica, se localizan a δ (ppm): 9 a 5.78 (d, $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH}_2\text{CO-}$), 10 a 6.94 (m, $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH}_2\text{CO-}$) y 11 a 1.84 (c, $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH}_2\text{CO-}$) y las correspondientes al extremo insaturado del monómero 3HHx a δ (ppm): 12 a 5.78 (d, $\text{C}_3\text{H}_7\text{-CH=CH-CH}_2\text{CO-}$), 13 a 6.94 (m, $\text{C}_3\text{H}_7\text{-CH=CH-CH}_2\text{CO-}$), 14 a 2.00 (m, $\text{C}_2\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{CO-}$), 15 a 1.55 (m, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{CO-}$) y 16 a 0.89 (t, $\text{CH}_3\text{-C}_2\text{H}_4\text{-CH=CH-CH}_2\text{CO-}$). Todas estas señales no se han observado en el polímero sin degradar térmicamente, lo que indica que se ha producido el proceso de degradación térmica esperado.⁶³ Mediante GPC se determinó el peso molecular del PHDN, obteniéndose el valor de ($\bar{M}_w = 26832 \text{ g mol}^{-1}$) y con una polidispersidad de 1.35. Por tanto, el proceso de degradación térmica da lugar a una reducción del peso molecular.

A partir de la integración de las señales de los protones metilénicos para los extremos de cadena del resto insaturado del monómero 3HB, $\delta = 1.84 \text{ ppm}$, y la integración de la señal correspondiente a los protones propilénicos del extremo de cadena del resto insaturado del monómero 3HHx, $\delta = 2.00 \text{ ppm}$, es posible determinar la relación de los extremos degradados de los distintos monómeros constituyentes del copolímero de partida P3HB3HHx. Así, la relación de cadenas degradadas 3HB/3HHx

es aproximadamente 51/40. Este resultado parece indicar que la degradación térmica se produce de modo preferente en la unidad mononérica 3HHx, ya que no se mantiene la relación composicional del polímero de partida (14 % en mol de 3HHx).

Mediante la integración de la señal de los protones metilénicos del 3HB y propilénicos del 3HHx de la cadena principal no degradada, $\delta = 1.31$ ppm, permite determinar la relación de monómeros en la cadena principal tras la degradación térmica, obteniéndose una composición molar de 11.10 % de 3HHx. Este valor es inferior al valor de la composición molar del 3HHx en el polímero de partida (14 % molar de 3HHx), lo que indica nuevamente la mayor degradación de este comonómero durante el proceso de degradación térmica llevado a cabo. Un comportamiento similar ha sido observado para otros copolímeros de P3HAs,⁶⁹ donde la degradación térmica es diferencial, siendo más pronunciada para la unidad en el copolímero con el sustituyente lateral de longitud de cadena más larga.

V-3.1.2. FUNCIONALIZACIÓN CON FURFURILAMINA DE LOS EXTREMOS ÁCIDOS DEL POLÍMERO PHDN: OBTENCIÓN DE PHDNF

La reacción entre la furfurilamina y el polímero degradado térmicamente se siguió del mismo modo mediante RMN de ^1H . El espectro de la furfurilamina empleada con la asignación de las señales correspondientes, se muestra en la Figura V-8.

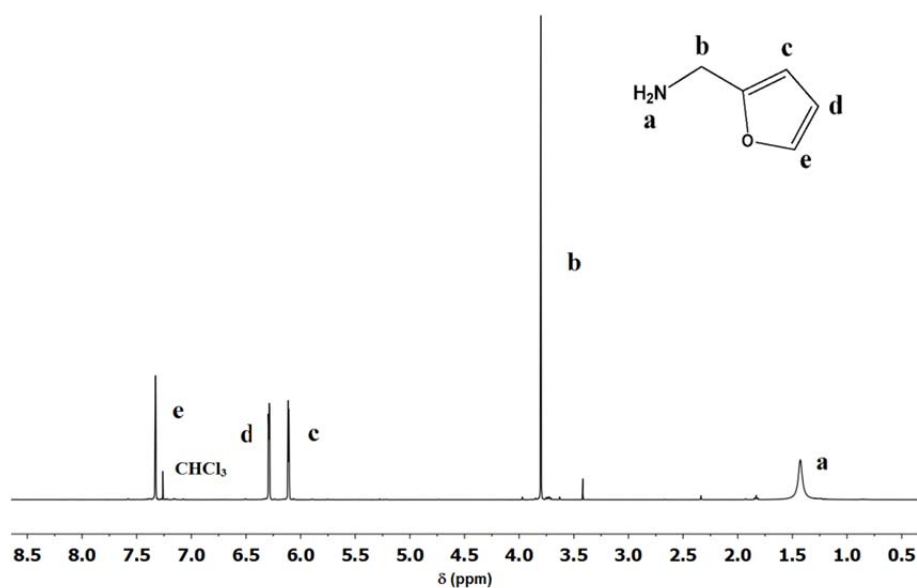


Figura V-8: Espectro de RMN de ^1H a temperatura ambiente de la furfurilamina usada para la obtención de PHDNF.

En la Figura V-8 se pueden observar las señales de la furfurilamina a δ (ppm): a 1.43 (s, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), b a 3.80 (s, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), c a 6.11 (c, $-\text{CH}=\text{CH}=\text{C-}$), d a 6.29 (c, $-\text{HC}=\text{CH}=\text{CH-}$) y e a 7.33 (c, $\text{O}=\text{CH-CH=}$).

Para realizar la reacción de los extremos ácidos del polímero PHDN con furfurilamina se disolvió el polímero en CH_2Cl_2 y se activó el extremo ácido con EDC, estabilizándose el intermedio posteriormente con NHS. Este intermedio estabilizado se hizo reaccionar con la furfurilamina obteniéndose el polímero funcionalizado en uno de los extremos. El resultado, denominado polímero PHDNF, se evaluó el resultado mediante RMN de ^1H , obteniéndose el espectro de la Figura V-9.

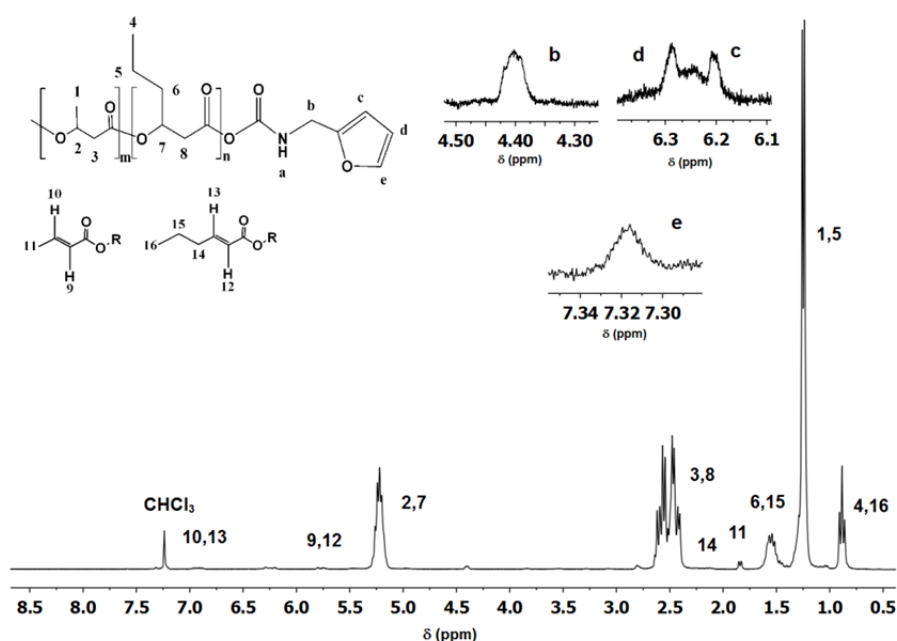


Figura V-9: Espectro de RMN de ^1H a temperatura ambiente del PHDNF empleado para la posterior funcionalización superficial de los CNTs, con la asignación de las señales.

El espectro de RMN de ^1H del polímero PHDNF presenta todas las señales correspondientes al PHDN (Figura V-7) más las señales correspondientes a la furfurilamina (Figura V-8), lo que indica que la reacción se ha producido. Los valores de δ (ppm) para la furfurilamina injertada son: b a 4.40 (s, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), c a 6.20 (c, $-\text{CH}=\text{CH}=\text{C-}$), d a 6.30 (c, $-\text{HC}=\text{CH}=\text{CH-}$) y e a 7.32 (c, $\text{O}=\text{CH-CH=}$). El mayor desplazamiento se observa para la señal b, donde además es posible apreciar un ensanchamiento de la señal como consecuencia de la disminución de la movilidad debida al injerto en el polímero.

El injerto de la furfurilamina en los extremos de cadena del polímero previamente degradado térmicamente (PHDN), produce un ligero aumento del peso molecular determinado por GPC ($\bar{M}_w = 50245 \text{ g mol}^{-1}$).

V-3.2. EVALUACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE LOS MWCNTs

Para la consecución de los objetivos del presente capítulo, la funcionalización superficial de los CNTs puede desempeñar un papel crucial. A fin de determinar si los distintos tratamientos de funcionalización propuestos han permitido la funcionalización de los MWCNTs, se emplearon diferentes técnicas de caracterización, incluyendo TEM, FTIR, microscopía Raman y XPS, presentándose los resultados obtenidos a continuación.

V-3.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La TEM permite la observación de los CNTs a escala nanométrica, haciendo accesible la observación de sus características superficiales. La Figura V-10 muestra las imágenes de TEM de los tres tipos diferentes de CNTs empleados en el presente capítulo.

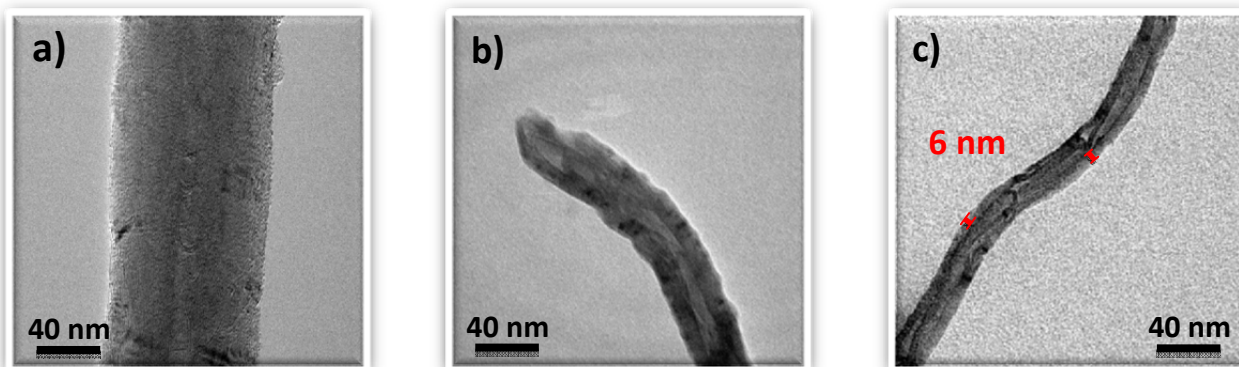


Figura V-10: Imágenes de TEM de a) pur-MWCNTs, b) oxi-MWNTCs y c) fun-MWNTCs.

Tal y como en la Figura V-10 a), los pur-MWCNTs presentan la estructura tubular característica de los CNTs con láminas gráficas concéntricas, indicativo de que el procedimiento de purificación no altera la estructura de los MWCNTs.

En el caso de los oxi-MWCNTs (Figura V-10 b)) el tratamiento químico produce una reducción de la relación de aspecto, reduciendo el espesor de los CNTs e introduciendo nuevos defectos en las paredes del nanotubo de carbono. Esta degradación estructural puede ser atribuida a las agresivas condiciones de funcionalización (disolución H_2SO_4 / HNO_3 ; 3:1) empleadas para el proceso de oxidación.

Cuando los MWCNTs purificados se funcionalizan con PHDNF (Figura V-10, c)) se observa una ligera disminución de la relación de aspecto, pero es posible observar claramente la presencia de una capa de polímero amorfo cubriendo el MWCNTs. El espesor de esta capa es de aproximadamente 6 nm, indicando la efectividad de la reacción de Diels-Alder para la funcionalización superficial de MWCNTs con P3HB3HHx.

V-3.2.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Los tratamientos químicos realizados a los CNTs, oxidación y funcionalización, producen la aparición de nuevos grupos funcionales sobre las paredes de los MWCNTs, que fueron detectados mediante espectroscopia infrarroja, Figura V-11.

El espectro de oxi-MWCNTs muestra un incremento en la banda a $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ como consecuencia de la oxidación y la aparición de un hombro en torno a 1730 cm^{-1} , atribuido a la extensión del enlace $\text{C}=\text{O}$ de los grupos ácidos introducidos.⁶²

Por otro lado, se observa la aparición de las bandas en las regiones $2800\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$ y $1480\text{-}1340\text{ cm}^{-1}$, atribuidos a los modos de extensión y deformación del enlace C-H respectivamente,⁷⁰ para oxi-MWCNTs y fun-MWCNTs. En el caso de oxi-MWCNTs la aparición de estos grupos funcionales puede ser atribuida a la rotura de la estructura gráfica de los MWCNTs producida por el tratamiento químico realizado. Para fun-MWCNTs, y dado que dichas bandas no se observan en los pur-MWCNTs a partir de los cuales son obtenidos los fun-MWCNTs, se deben a las vibraciones de los enlaces de los grupos alquilo del polímero adherido a las paredes de los MWCNTs.³⁸ Además, fun-MWCNTs presenta nuevas bandas en la región de $1300\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$,

asignadas con la vibración del enlace C-O-C del P3HB3HHx,^{71,72} sugiriendo el injerto de PHDNF sobre las paredes externas de los MWCNTs.

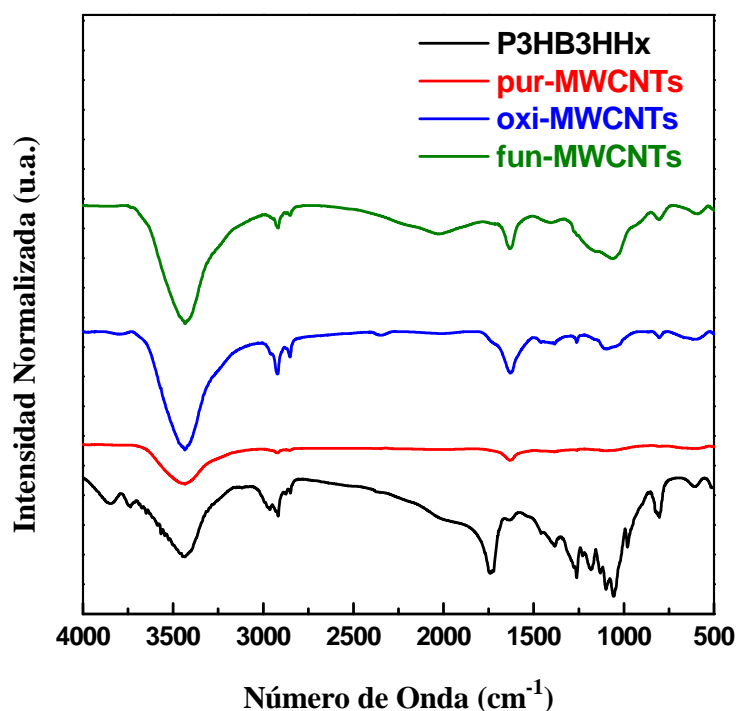


Figura V-11: Espectros de FTIR de los tres tipos de MWCNTs empleados en la obtención de los composites y P3HB3HHx empleado como referencia. Los espectros han sido desplazados verticalmente por claridad.

Para todas las muestras se observó una banda ancha en la región $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, como consecuencia de los modos de vibración de los grupos --OH , indicativo de la presencia de agua quimisorbida en las muestras durante la preparación de las pastillas de KBr.⁷³

V-3.2.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

La microscopía Raman es una poderosa herramienta para la caracterización estructural de los materiales gráficos, como los MWCNTs⁷⁴ y se utiliza habitualmente para el estudio de la estructura.⁷⁵ Tal y como se observa en la Figura V-12, espectro Raman del P3HB3HHx presenta una serie de bandas características: extensión de los enlaces C-H ($2880\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$), C=O (1730 cm^{-1}) y C-O (1058 cm^{-1}), deformación asimétrica del CH₃ (1460 cm^{-1}) y extensión del enlace C-O-C y deformación del C-H (1262 cm^{-1}).^{75,76}

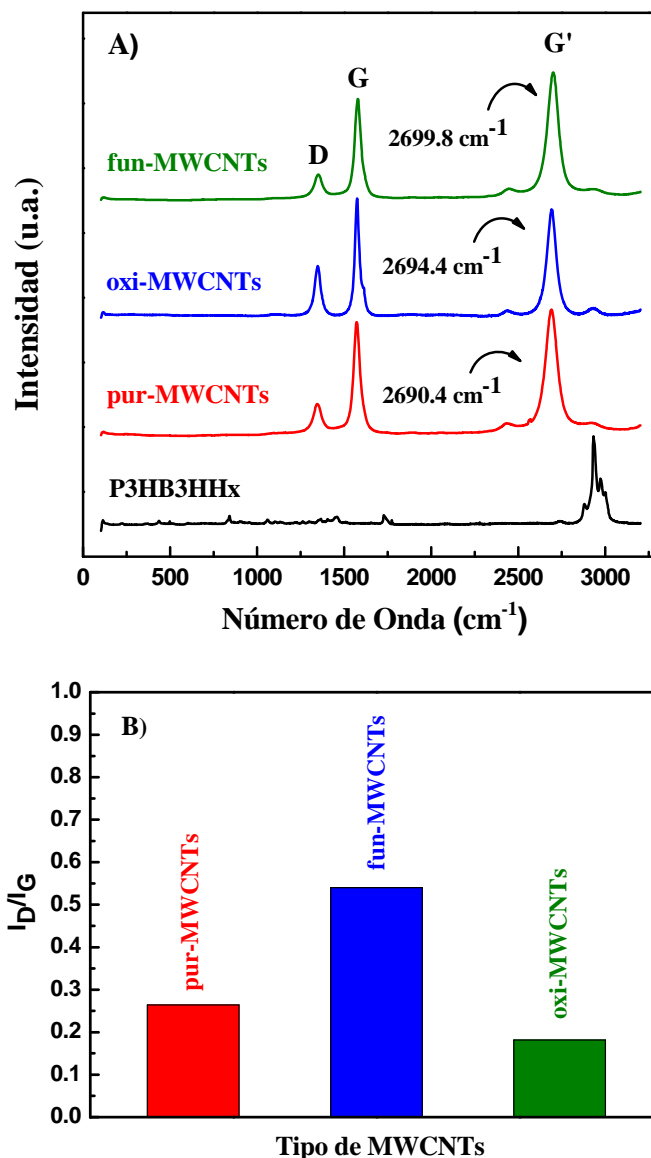


Figura V-12: A) Espectros Raman de los pur-MWCNTs, oxi-MWCNTs, fun-MWCNTs y el polímero P3HB3HHx (los espectros se han desplazado en el eje y por claridad) y B) relación de intensidades de las bandas *D* y *G* para cada uno de los tres tipos de CNTs obtenidas a partir de los espectros Raman correspondientes.

Los espectros Raman de los tres tipos de CNTs empleados también se muestran en la Figura V-12, donde se pueden observar las tres bandas características de este tipo de CNTs: la banda *G* (atribuida a la extensión tangencial en el plano de los enlaces C-C en las láminas de grafeno) aparece alrededor de 1570 cm⁻¹, mientras que la banda *D* (atribuida a la presencia de desórdenes o carbono amorfo en los materiales grafiticos) se observa a aproximadamente 1347 cm⁻¹ y la banda *G'* (segundo armónico de la banda *D*) a 2690 cm⁻¹.

Se observa claramente un incremento en la intensidad relativa de la banda *D* para oxi-MWCNTs, debido al carbono sp^3 , lo que confirma la ruptura del sistema aromático de electrones *p* como consecuencia de la funcionalización.⁷⁷ Además, también se puede apreciar que se produce la aparición de un pequeño hombro alrededor de 1610 cm^{-1} correspondiente a la banda *D'*, lo que confirma la inclusión de nuevos defectos. Sin embargo, el espectro de los fun-MWCNTs no presentó grandes diferencias comparado con el de los pur-MWCNTs y las bandas del P3HB3HHx no se observaron en los fun-MWCNTs. Pero la banda *G'* de los fun-MWCNTs se desplazó a valores de número de onda mayores en comparación con los otros dos tipos de CNTs. Este desplazamiento más acusado indica una interacción mayor entre las paredes laterales del CNTs con el polímero.^{66,78}

La Figura V-12 B) muestra el valor de la relación entre la integral de las señales de las bandas *D* y *G* (I_D/I_G) de los nanotubos de carbono, calculado a partir de la deconvolución Lorentziana de ambas bandas, relación que se usa de modo usual para evaluar la cantidad de defectos de los CNTs. Se observó un incremento de dicha relación para los oxi-MWCNTs debido a que el fuerte tratamiento ácido aplicado produce la destrucción de la estructura gráfica. Para los fun-MWCNTs la reducción del relación I_D/I_G , se relaciona con las cadenas poliméricas ancladas a las paredes de los CNTs, que modifican las propiedades electrónicas de los MWCNTs como consecuencia de la transferencia de energía entre los CNTs y las cadenas poliméricas.⁷⁹

V-3.2.4. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELECTRONES EMITIDOS POR RAYOS X

La espectroscopia XPS proporciona información de la composición química superficial y los enlaces químicos de las muestras, en nuestro caso, los CNTs. El espectro del C_{1s} y del O_{1s} del P3HB3HHx, pur-MWCNTs, oxi-MWCNTs y fun-MWCNTs se muestran en la Figura V-13.

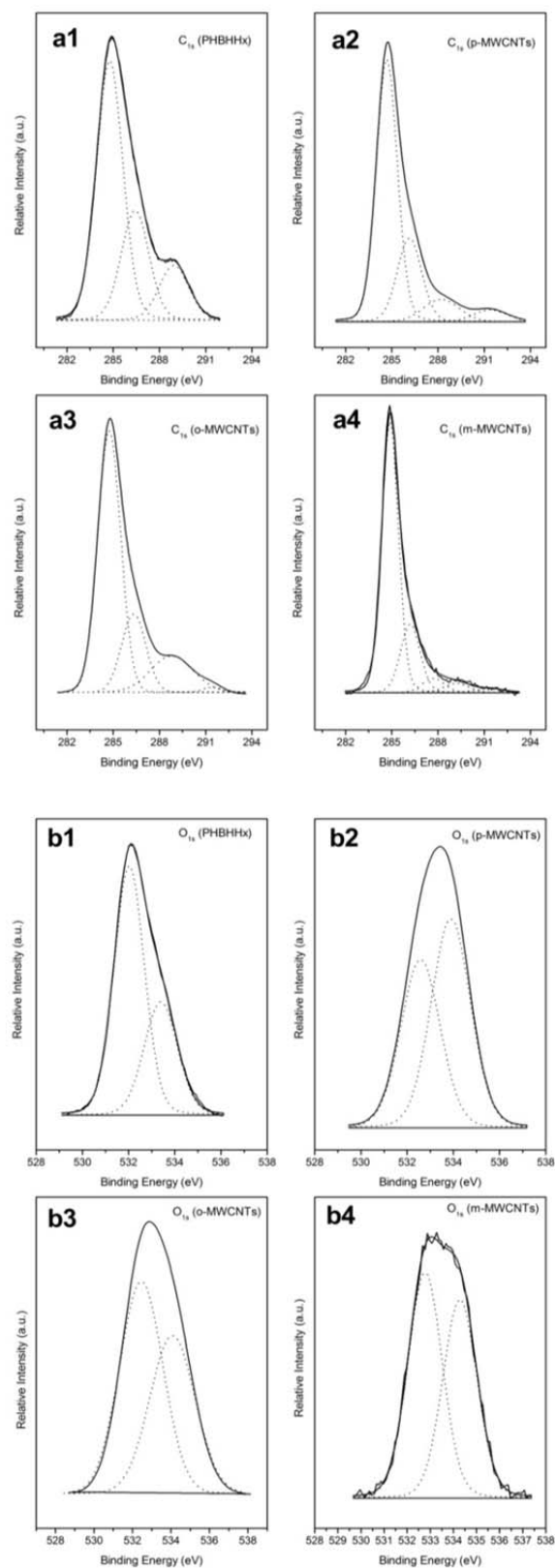


Figura V-13: Deconvolución de los picos de a) XPS del C_{1s} y b) XPS del O_{1s} de:
1) P3HB3HHx, 2) pur-MWCNTs, 3) oxi-MWCNTs y 4) fun-MWCNTs.

En el caso del P3HB3HHx, el espectro del C_{1s} (Figura V-13 1a)) muestra tres componentes relacionados con la estructura del polímero: la primera alrededor de 248.8 eV asignado a los carbonos alifáticos ($-CH_2$, CH_3), la segunda a 286.4 eV atribuidos a los enlaces éter ($-C-O-C-$) de la cadena principal y la tercera a 288.9 eV correspondiente al carbono carbonílico ($-C=O$).^{53,80} Los señales del espectro del O_{1s} del P3HB3HHx (Figura V-13 b1)) se detectaron a 532.0 eV ($O=C-$) y 533.4 eV ($-O-C-$).

En el caso de los CNTs, el espectro del C_{1s} (Figura V-13 a2_44)) muestra un solo pico a 284.4 eV asignado a los enlaces sp^2 C-C del carbono grafitico. En la deconvolución de la señal del C_{1s} en los correspondientes espectros se ha asignado un dos picos, uno entre 285-286 eV asociado a los átomos de C sp^3 y otro en la región 286.3-290.5 eV asignado al carbono unido a los distintos grupos oxigenados.^{81,82}

La deconvolución de los espectros del O_{1s} de los MWCNTs se centró en dos picos a 532.6 eV y 534.1 eV, correspondientes a los grupos $O=C$ superficiales y a los enlaces O-C, respectivamente.⁸¹ Tal y como se puede observar en la Figura V-13 a3), la oxidación de los MWCNTs introduce nuevos grupos funcionales en la superficie de las nanocargas, lo que produjo una reducción de las capas de carbono grafitico. Por otra parte, los espectros de XPS de los fun-MWCNTs (Figura V-13 a4) y b4)) muestran un incremento en las áreas de los picos de los grupos carboxílicos e hidroxílicos, en comparación con los observados en pur-MWCNTs. Esto es una consecuencia del injerto de P3HB3HHx de bajo peso molecular, lo que confirma la funcionalización superficial de los fun-MWCNTs. La Tabla V-1 presentan las energías de enlace y las cantidades relativas en los tres tipos de nanotubos de carbono y el polímero.

La oxidación de los MWCNTs produce una disminución acusada del valor de la relación C_{1s}/O_{1s} para oxi-MWCNTS. Dicha disminución se debe a la introducción de nuevos grupos funcionales con átomos de oxígeno y a la pérdida de la estructura grafitica de los CNTs producida por el agresivo tratamiento químico.

Tabla V-1: Energías de enlace y cantidades relativas de los átomos C_{1s} y O_{1s} en los tres tipos de CNTs y el P3HB3HHx, determinadas mediante XPS.

Muestra	Pico ajustado C _{1s} (%)				Pico ajustado O _{1s} (%)		Relación C _{1s} /O _{1s}
	C-C <i>sp</i> ² , <i>sp</i> ³	C-O	C=O	π - π^*	O=C	O-C	
P3HB3HHx	284.8 (47)	286.4 (21)	288.9 (11)	-	532.0 (14)	533.4 (7)	7.0
pur-MWCNTs	284.8 (81)	286.1 (8)	-	291.0 (5)	532.6 (3)	534.1 (3)	110.0
oxi-MWCNTs	284.8 (47)	286.2 (10)	289.1 (8)	-	532.8 (21)	534.3 (14)	4.6
fun-MWCNTs	284.8 (52)	286.2 (18)	289.2 (11)	-	532.9 (10)	534.3 (9)	7.4

Tal y como se observa en la Tabla V-1, fun-MWCNTs presenta un relación C_{1s}/O_{1s} muy similar al del P3HB3HHx, confirmando la unión del P3HB3HHx de bajo peso molecular a lo largo de todas las paredes laterales de los pur-MWCNTs.

V-3.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS PROPIEDADES DE LOS COMPOSITES SEMICONDUCTORES

En este apartado se discuten los resultados obtenidos en función de la técnica de caracterización empleada en cada caso. El estudio se realizará de modo comparativo atendiendo principalmente a dos factores, la cantidad de carga en el composite y el tipo de nanotubo de carbono utilizado.

En la Tabla V-2, se presenta la nomenclatura empleada en el presente apartado. Todas las muestras se han identificado con la letra C, seguida de un número, indicativo del tipo de nanotubo de carbono empleado como carga, y una letra, en referencia a la cantidad en peso de carga añadida a la matriz polimérica. En todos los casos se ha empleado el mismo copolímero como matriz polimérica, P3HB3HHx.

Tabla V-2: Identificación de las muestras de composites empleadas en este apartado, con la cantidad y el tipo de nanotubo de carbono empleado en cada caso.

Muestra	Tipo de CNT ^a	% (p/p) CNT/polímero
C-0	-	0.0
C-1-a	Purificado	0.3
C-1-b		0.6
C-1-c		1.2
C-2-a	Oxidado	0.3
C-2-b		0.6
C-2-c		1.2
C-3-a	Funcionalizado	0.3
C-3-b		0.6
C-3-c		1.2

^{a)} purificado = sin funcionalización superficial; oxidado = grupos ácidos, CO₂H, y alcoholes, OH, en los defectos superficiales; funcionalizado = PHDNF anclado a los defectos superficiales de los CNTs.

La muestra C-0 es una película de P3HB3HHx obtenida por colada, empleando el mismo proceso que para la obtención de los composites. Esta película se empleará como referencia para determinar la variación de las propiedades del polímero producidas como consecuencia de la adición de los CNTs.

V-3.3.1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS NANOTUBOS DE CARBONO EN LA MATRIZ POLIMÉRICA

V-3.3.1.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La distribución e interacción de los nanotubos de carbono con la matriz polimérica se analizó mediante microscopía electrónica de barrido. En primer lugar se intentó determinar la distribución de las cargas en la matriz, mediante la observación en el SEM de un corte transversal de todos los composites y el polímero utilizado como blanco. Las imágenes obtenidas a distintas magnificaciones se muestran en la Figura V-14.

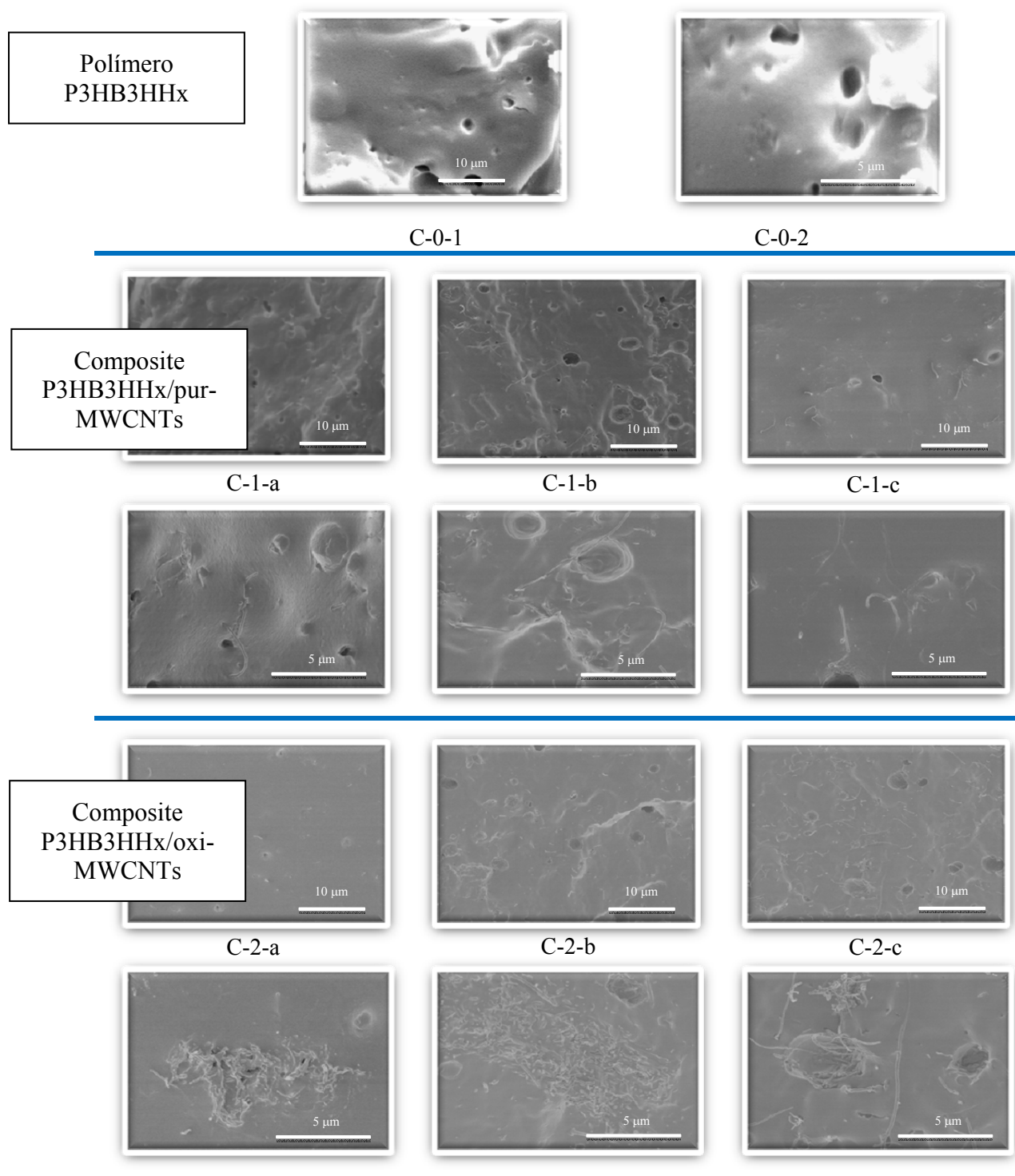


Figura V-14: Imágenes de SEM de un corte transversal de los composites a diferentes aumentos, 3500X (barra de escala 10 μm), parte superior de la leyenda y 10000X (barra de escala 5 μm), parte inferior de la leyenda.

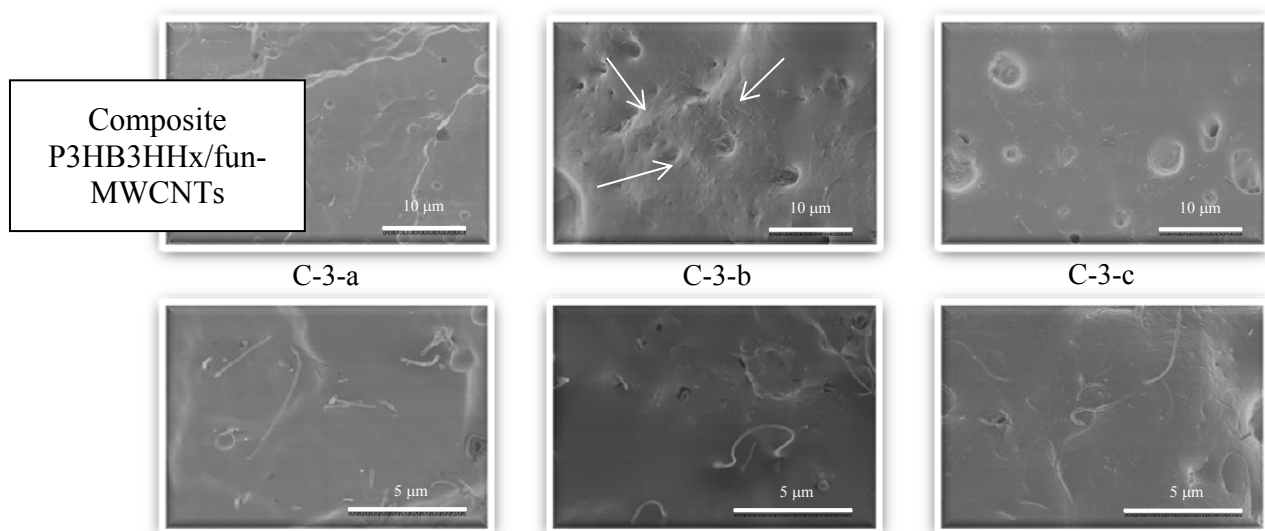


Figura V-14, continuación: Imágenes de SEM de un corte transversal de los composites a diferentes aumentos, 3500X (barra de escala 10 µm), parte superior de la leyenda y 10000X (barra de escala 5 µm), parte inferior de la leyenda.

A la vista de las imágenes de microscopía electrónica de barrido del corte transversal se pueden apreciar las diferencias en la distribución de los nanotubos de carbono en el seno de la matriz polimérica constituyente del composite.

En el caso de los composites C-1, con los nanotubos de carbono purificados, se puede observar la existencia de zonas con mayor concentración de carga, separadas por zonas constituidas sólo por polímero. A pesar de las acumulaciones de carga, no fue posible observar la presencia de aglomerados. No se observan huellas dejadas por los nanotubos de carbono al realizar el corte transversal, indicando que podría existir una buena interacción matriz-CNT.

Cuando se observan a 3500X los composites C-2 (imágenes de la parte superior), es posible apreciar algunas diferencias. La muestra C-2-a presenta grandes zonas libres de carga, en las que sólo es posible ver la película de polímero. Al aumentar el contenido en carga, es el caso de los composites C-2-b y C-2-c, respectivamente, puede observarse que estas zonas formadas por polímero alternan con regiones en las que se aprecia una gran acumulación de CNTs. Sin embargo, las microfotografías de las muestras C-2 a una mayor magnitud (10000X), presentadas en la parte inferior, muestran aglomerados de gran tamaño. Un barrido a lo largo de las muestras permite

confirmar que estos aglomerados aparecen con gran frecuencia, pudiéndose determinar que es el modo habitual en el que este tipo de nanotubos de carbono interacciona con la matriz polimérica.

Las muestras presentan un aspecto diferente cuando se emplean CNTs funcionalizados (muestras C-3). En todos los casos, independientemente de la carga y de los aumentos empleados, se observó una distribución homogénea de los nanotubos de carbono en el composite, sin la aparición de grandes acumulaciones de los mismos. Tampoco se apreciaron huellas dejadas por los nanotubos de carbono en la matriz, y sí rugosidades en las imágenes a 3500X que pueden atribuirse a la presencia de CNTs recubiertos por el polímero. Estas rugosidades se indican con flechas en la imagen a 3500X de la muestra C-3-b a modo de ejemplo (Figura V-14).

Para todas las muestras se produce un aumento de los nanotubos de carbono accesibles a observación en el corte transversal al aumentar la cantidad de nanocargas añadidas, indicando la mayor cantidad de los tres tipos de CNTs en la matriz, tal y como cabría esperar.

Para estudiar con más detalle la interacción entre el polímero y los distintos tipos de nanotubos de carbono, purificados, oxidados y funcionalizados con PHDNF, se realizó una fotografía a 40000X de cada clase de composite, mostrándose las imágenes en la Figura V-15.

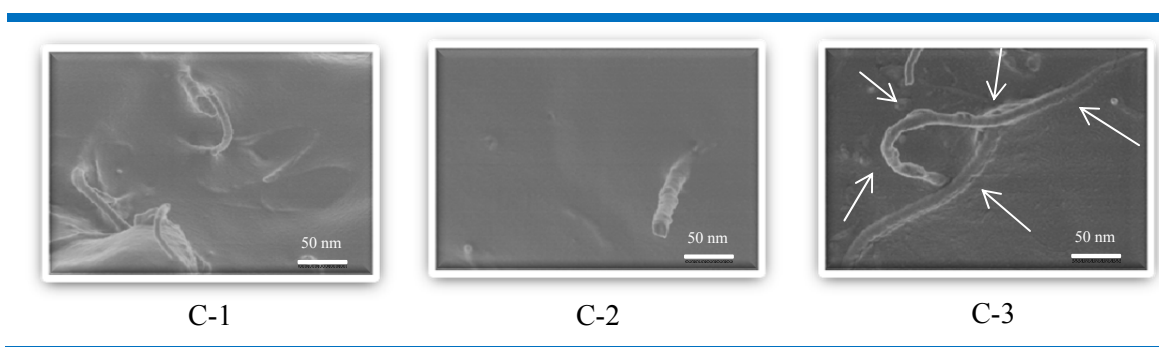


Figura V-15: Imágenes de microscopía electrónica de barrido a 40000X, de la interfase de los nanotubos de carbono con la matriz polimérica para cada tipo de composite con 0.6 % de CNTs.

Centrándose en uno o varios nanotubos de carbono la interacción se analizó a partir de la apariencia superficial de los mismos. Para C-1 se observa que el nanotubo de

carbono sale de la matriz polimérica, sin dejar huella, lo que indica una interacción adecuada, pero que el polímero no se encuentra recubriendo el CNT. Este mismo efecto es el observado cuando el nanotubo de carbono está oxidado, es decir, para los composites C-2. Tampoco se encontraron huellas dejadas por los nanotubos de carbono durante la preparación de las muestras. En el tercer tipo de composites, C-3, se observó una buena interacción carga-matriz, con nanotubos de carbono recubiertos que salen de la matriz polimérica sin romperla y posibles acúmulos de polímero en sus superficies (flechas blancas Figura V-15, imagen C-3). Si bien estas observaciones no confirman de modo definitivo la preferencia del P3HB3HHx por ninguno de los tres tipos de carga, si que parece que los composites con los nanotubos de carbono funcionalizados presentan una interacción más adecuada con la matriz, confirmando lo observado en la Figura V-14.

Dado que para los composites con la misma cantidad de carga se ha observado la presencia de desiguales cantidades en la matriz en función del tipo de nanotubo de carbono empleado, se tomaron fotografías (Figura V-16) en perspectiva de la superficie de los composites, con el propósito de determinar si se había producido migración de los CNTs.

En todos los composites parece apreciarse un ligero aumento de la rugosidad superficial como consecuencia del incremento de la cantidad de carga en el composite, $C-a < C-b < C-c$. Este efecto será estudiado con detenimiento en el apartado V-3.3.3., mediante microscopía de fuerza atómica.

Tal y como se observa en la Figura V-16, los composites C-1 presentan una cantidad creciente de CNTs purificados en su superficie al aumentar la cantidad añadida al polímero. Esta observación, junto con el hecho de que no se observaron grandes cantidades de carga en la matriz de estos composites, indica que se ha producido la migración de la mayoría de los nanotubos de carbono a la superficie de estas muestras. Este efecto a consecuencia de la decantación de los CNTs hacia el fondo de la disolución de polímero, ya que la superficie en la que se observaron los CNTs es la superficie en contacto con el molde.

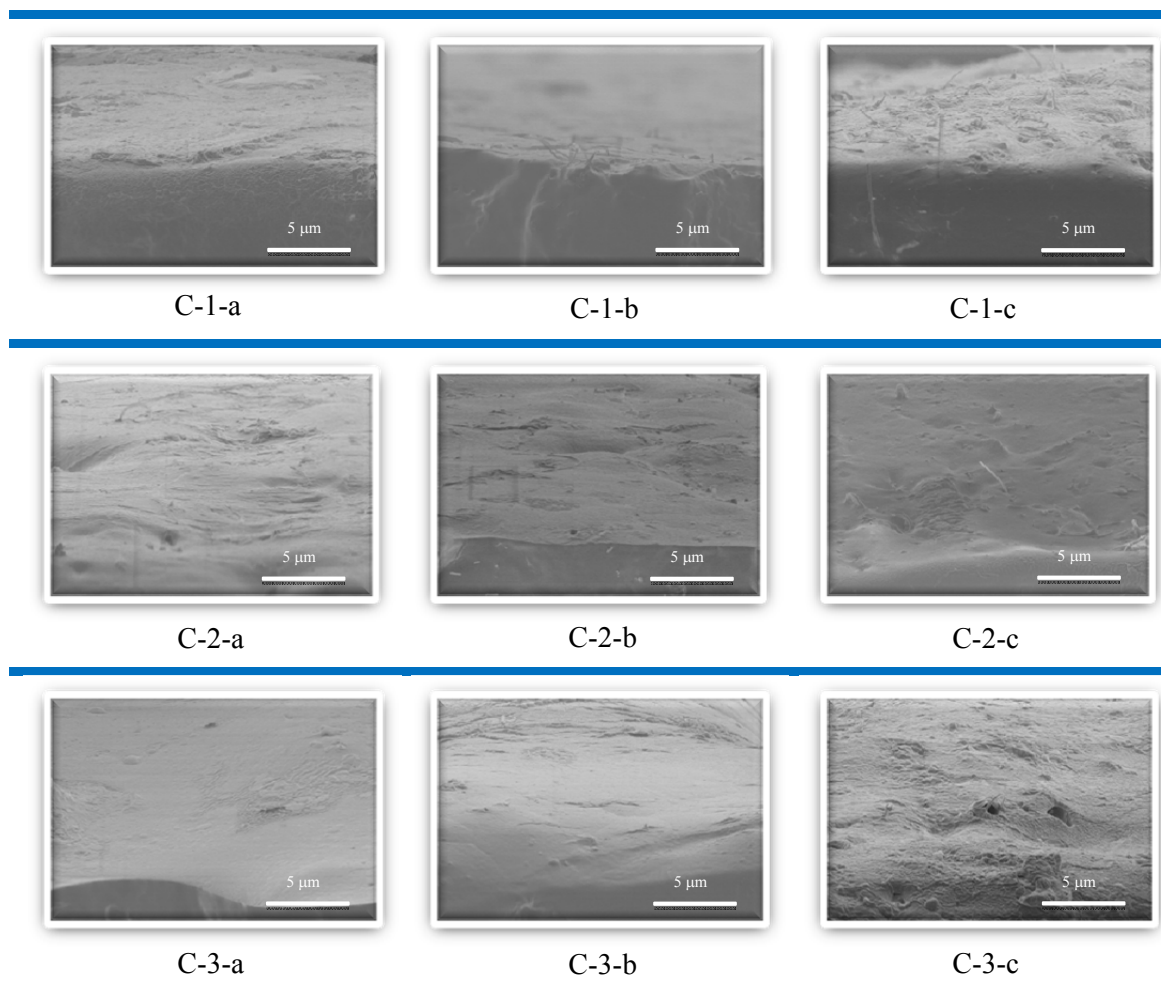


Figura V-16: Imágenes de microscopía electrónica de barrido a 7000X de la superficie de los composites vistas en perspectiva.

Para el caso de los nanotubos oxidados, C-2-a, C-2-b y C-2-c de la Figura V-16, el acumulo de los mismos en la superficie no es excesivo, con un ligero incremento a medida que aumenta la cantidad en la matriz polimérica. Estos resultados confirman que los nanotubos de carbono oxidados se encuentran mayoritariamente en el interior del polímero.

La buena interacción carga-polímero, cuando los CNTs se funcionalizaron con PHDNF (muestras C3), parece confirmarse con la ausencia casi total de nanotubos de carbono en la superficie de las muestras observadas. Sólo la máxima adición de carga, C-3-c, permite observar algún CNT en la superficie del composite.

De modo global, y a partir del estudio completo de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido, se pueden obtener algunas conclusiones:

- Los CNTs purificados interaccionan pobremente con el polímero, siendo expulsados hacia la superficie o, en mucha menor medida, aparecen acumulados en la matriz polimérica.
- Los CNTs oxidados, si bien no son expulsados de la matriz polimérica hacia la superficie, aparecen como aglomerados en el polímero, lo que podría indicar que su superficie no muestra las condiciones idóneas para dispersarse en la matriz.
- Los CNTs funcionalizados con PHDNF, muestran unas características superficiales más adecuadas para la interacción con el polímero, tal y como era esperable. Esto da como resultado una distribución que parece homogénea en la matriz polimérica, sin migración a la superficie, y con la ausencia de acúmulos o aglomerados.

V-3.3.2. PROPIEDADES TÉRMICAS

V-3.3.2.1. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

El estudio de la pérdida de peso de la muestra en función de la temperatura nos aportará información del efecto que las nanocargas pueden tener en la degradación del polímero. Para ello se realizaron los termogramas de todas las muestras en atmósfera de aire. Las pérdidas de peso, en %, frente a la temperatura, para todas las muestras se representan en la Figura V-17. La Figura V-17-C), incluye el termograma del polímero degradado térmicamente y modificado con furfurilamina, PHNDF.

La observación de la Figura V-17 muestra que la adición de los nanotubos de carbono produce un aumento de la temperatura de degradación de la matriz polimérica.

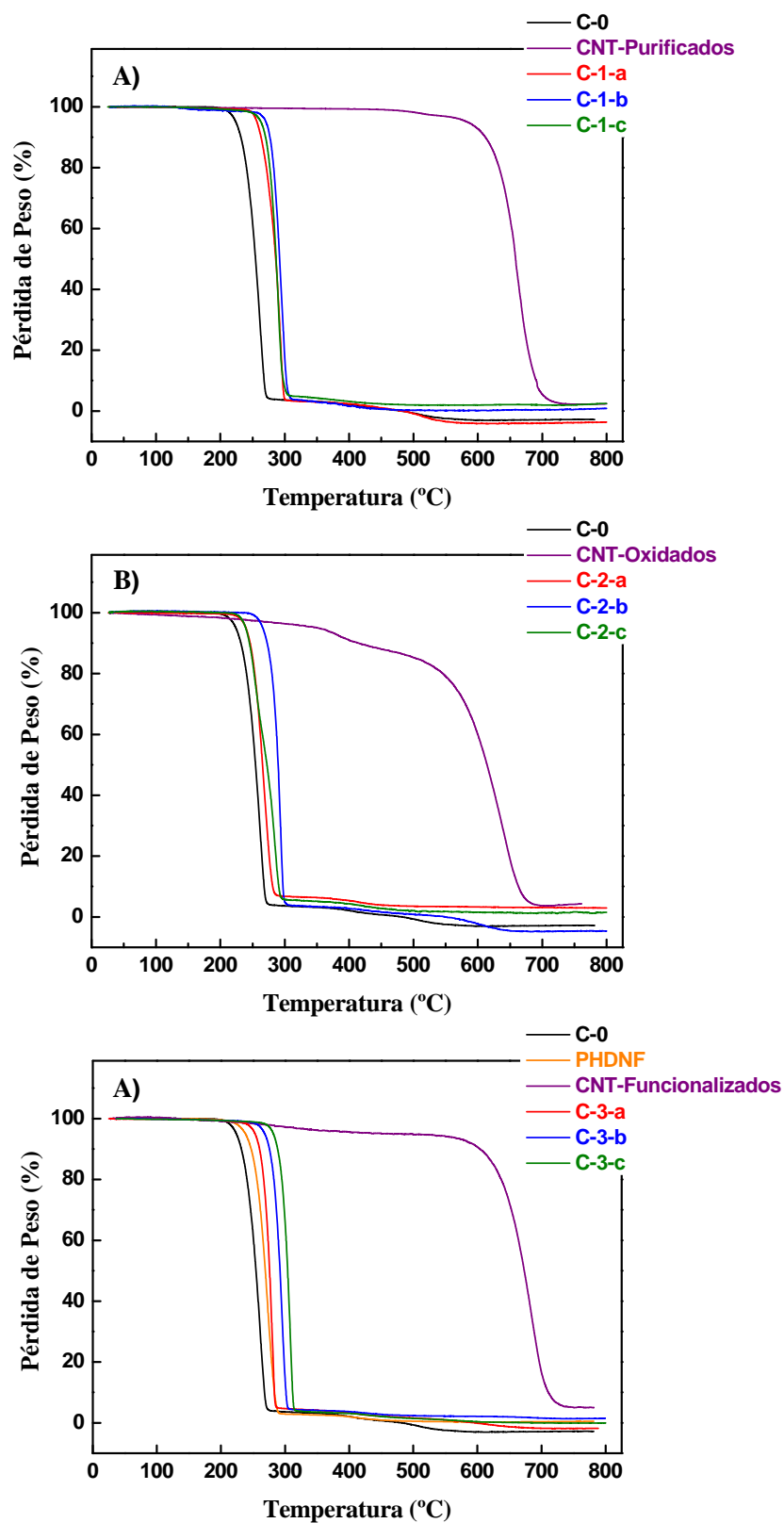


Figura V-17: Termogramas en atmósfera de aire de los distintos composites y los nanotubos de carbono usados en cada síntesis, así como de los polímeros usados para A) composites C-1, B) composites C-2 y C) composites C-3.

Los tres tipos de nanotubos de carbono presentan perdidas de peso a distintas temperaturas. Para los pur-MWCNTs, la pérdida de peso a 510 °C se asocia con la combustión de los restos de carbono amorfo remanente tras el proceso de purificación. Las pérdidas de peso entre 150-450 °C se atribuyen a la descomposición de los grupos químicamente anclados a las paredes de los nanotubos de carbono.⁸³ En el caso de los oxi-MWCNTs la pérdida de peso se puede atribuir a la combustión de los grupos -COOH y -OH con los que han sido funcionalizados. Para los nanotubos de carbono funcionalizados la pérdida de peso en trono a 310 °C no se atribuye a los nanotubos utilizados en su obtención, ya que los nanotubos purificados presentan una pérdida de peso anterior a la combustión en torno a los 510 °C (Figura V-17-A) y Tabla V-3); en este caso la pérdida de peso puede atribuirse a la funcionalización superficial de los CNTs y a la degradación del polímero PHDNF. El incremento de ~ 40 °C (Tabla V-3) en el máximo de la temperatura de degradación del polímero PHDNF demuestra un aumento de la resistencia térmica del polímero cuando se ancla sobre la superficie del nanotubo.

Tabla V-3: Valores de la $T_{máx}$ para los diferentes composites, el polímero PHDNF (P3HB3HHx degradado térmicamente y funcionalizado con furfurilamina), así como las temperaturas de degradación de los tres tipos de MWCNTs utilizados.

Muestra	$T_{máx}$ (°C)	T_l (°C)
C-0	260.76	-
C-1-a	292.73	-
C-1-b	294.46	-
C-1-c	289.57	-
C-2-a	267.47	-
C-2-b	292.71	-
C-2-c	284.34	-
C-3-a	290.61	-
C-3-b	295.40	-
C-3-c	296.70	-
PHDNF	271.91	-
Pur-MWCNTs	658.63	510.78
Oxi-MWCNTs	643.42	382.08
Fun-MWCNTs	683.83	310.32

T_l representa la primera pérdida de peso de los CNTs, asociada con la pérdida del carbono amorfo remanente para pur-MWCNTs, la descomposición de los grupos -COOH y -OH covalentemente unidos a la superficie de oxi-MWCNTs y al proceso de

descomposición del polímero PHDNF covalentemente unido a la superficie de los fun-MWCNTs, respectivamente.

Los valores de la temperatura máxima de la descomposición térmica ($T_{máx}$) se han determinado a partir del máximo del pico correspondiente a la primera derivada de la pérdida de peso con respecto a la temperatura.

Los valores de la Tabla V-3 reflejan el aumento de la temperatura de combustión de los composites debido a la adición de las nanocargas, tal y como se observa con claridad en la Figura V-19, con incrementos entre 24-36 °C. Este efecto se ha atribuido a la presencia de nanotubos de carbono en la matriz, que entorpece la difusión de los productos de degradación desde la matriz polimérica hasta la fase gaseosa.⁸³

Las muestras C-1 y C-2 no presentan una dependencia en la variación de la temperatura de degradación con respecto a la cantidad de CNTs. Sin embargo, en los composites C-3, se observó un aumento progresivo de la temperatura de degradación dependiente de la cantidad de nanotubos de carbono presentes en la muestra. Este hecho puede ser explicado como consecuencia de la disminución de la resistencia térmica en la interfase CNT-polímero debida a la mejor interacción de los fun-MWCNTs-P3HB3HHx. Esta disminución de la resistencia térmica en la interfase, produciría un incremento en la conductividad térmica que facilita la disipación de calor en el composite. Este efecto ya ha sido descrito para otros polímeros, como el polipropileno o la poliéter éter cetona.^{83,84}

V-3.3.2.2. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Mediante el empleo de la calorimetría diferencial de barrido se estudió la posible variación en las temperaturas de transición vítrea y de fusión, así como en las entalpías de fusión y se calculó la cristalinidad de las matrices poliméricas de P3HB3HHx, como consecuencia de la interacción con los CNTs. La Figura V-18 muestra los termogramas obtenidos para cada tipo de composite y su comparación con el P3HB3HHx usado como referencia.

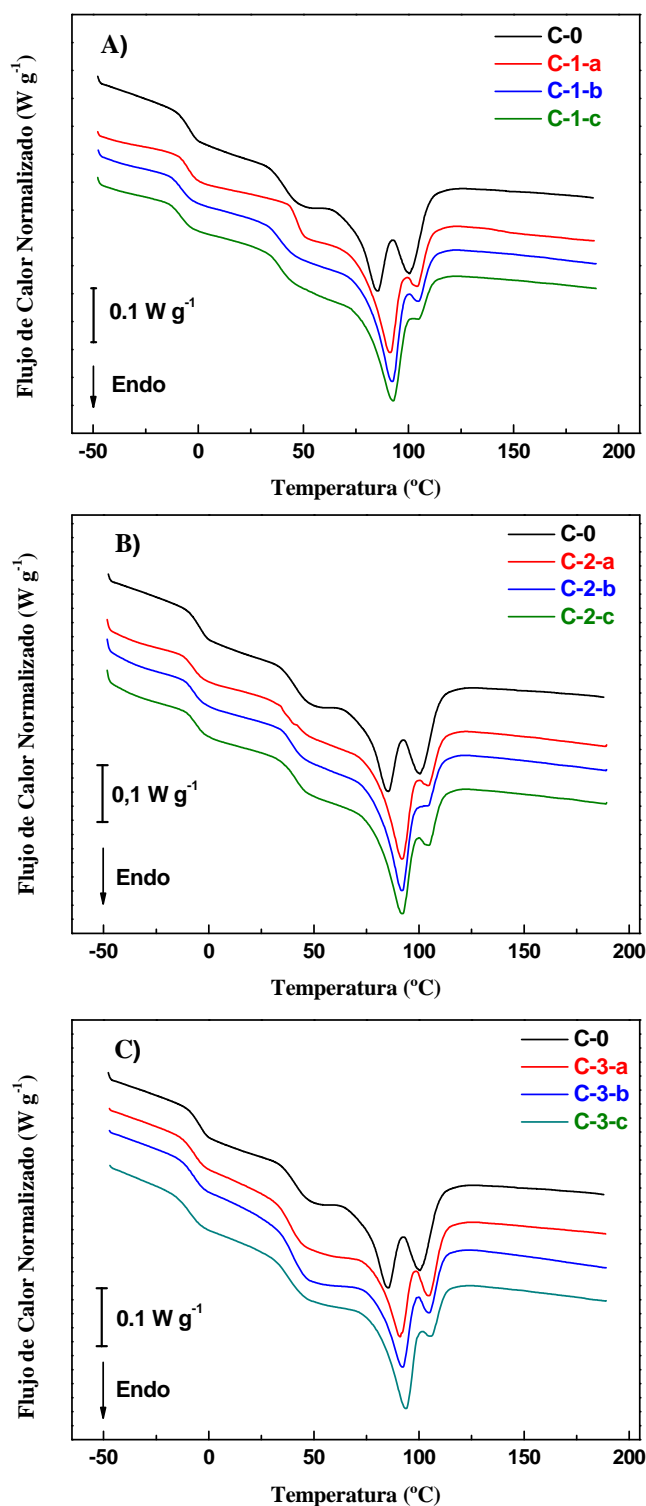


Figura V-18: Representación de los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido para la película del copolímero P3HB3HHx y A) composites C-1, B) composites C-2 y C) composites C-3.

Todos los termogramas muestran dos endotermas de fusión solapadas características del P3HB3HHx. Es conocido que tanto el PHB como sus copolímeros

experimentan fenómenos de fusión-recristalización-fusión durante el calentamiento, lo que origina la aparición de endotermas múltiples.⁸⁵⁻⁸⁸ Este comportamiento se manifiesta de modo mas complejo en los copolímeros.^{67,89}

Los picos debidos a la fusión de los cristales primarios ($T_{m2} \sim 88$ °C) y la fusión de los cristales formados por recristalización durante el proceso de calentamiento⁹⁰ ($T_{m3} \sim 102$ °C) se encuentran presentes en todas las muestras de igual modo que en la muestra de referencia. Sin embargo, el pico de fusión a menor temperatura, asociado a los procesos de cristalización previos de las cadenas de más bajo peso molecular, se ve afectado por las cargas, solapándose de modo más intenso con el segundo pico de fusión en las muestras con nanotubos de carbono que en el polímero de referencia. Esta leve variación en el comportamiento de fusión puede deberse a la influencia de los nanotubos de carbono actuando como puntos de nucleación, favoreciendo la formación de cristales de mayor tamaño.

De un modo cualitativo se pueden observar algunas variaciones en los valores de T_m , que junto con los valores de ΔH_m y el grado de cristalinidad (X_c) se presentan en la Tabla V-4. Para los composites C-3 se determinó un aumento de la entalpía de fusión, y un incremento de la cristalinidad de ~ 5 %, no apreciado para el resto de composites. Este efecto se atribuye a la influencia de los fun-MWCNTs, cuya mejor interacción con la matriz polimérica hace que actúen como puntos de nucleación, aumentando la cristalinidad.⁹¹

Por otra parte se observó una disminución de la T_g en los composites con respecto a la película de referencia. Este efecto puede atribuirse a la falta de restricción de la movilidad de los segmentos y cadenas poliméricas como consecuencia de la interacción con los CNTs.⁸⁴ Cuando los CNTs se anclan a las cadenas poliméricas de la matriz, se produce una restricción de la movilidad de dichas cadenas, dando lugar a un aumento de la T_g . La metodología escogida en nuestro caso incrementa la interacción con la matriz empleando funcionalización superficial de los CNTs sin anclarlos a la matriz, lo que mantiene la movilidad de las cadenas poliméricas del P3HB3HHx, y da como resultado la disminución de la T_g de los composites.

Tabla V-4: Valores de T_m , ΔH_m y T_g determinados a partir del análisis de los termogramas de los composites y la muestra de referencia.

Muestra	ΔH_m (J g ⁻¹)	X_c (%) [*]	T_g (°C) ^a	T_g (°C) ^b	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)
C-0	44.8	30.1	-3.5	-5.4	85.4	99.4
C-1-a	41.6	27.9	-5.0	-4.3	91.3	104.2
C-1-b	44.8	30.0	-8.9	-5.3	92.3	104.8
C-1-c	45.1	30.3	-8.2	-5.8	92.9	104.6
C-2-a	43.5	29.2	-7.0	-5.4	92.0	104.5
C-2-b	44.9	30.1	-7.7	-4.8	91.9	102.8
C-2-c	44.8	30.1	-5.5	-5.5	92.2	104.7
C-3-a	51.4	34.5	-6.5	-4.7	91.1	104.7
C-3-b	52.6	35.5	-6.5	-4.5	92.2	104.9
C-3-c	52.2	35.1	-9.0	-5.3	93.8	105.8

^a Determinada por DSC a partir del primer calentamiento de la muestra.

^b Determinada por DSC a partir del enfriamiento de la muestra.

* El grado de cristalinidad, X_c (%), de los polímeros y composites se determinó a partir de la siguiente expresión:

$$X_c (\%) = (H_f/H_{100\%}) \times 100$$

Donde H_f es la entalpía de fusión aparente de la matriz polimérica y $H_{100\%}$ es la entalpía de fusión teórica del PHB 100 % cristalino (149.4 J g⁻¹).^{71,92}

Las temperaturas de fusión T_{m2} y T_{m3} se ven afectadas por la adición de las cargas, observándose un aumento de sus valores y una dependencia con la cantidad de nanocarga añadida para las muestras C-3. La conductividad térmica de los CNTs puede influir aumentando la capacidad de disipación térmica de los composites, desplazando la temperatura de fusión a valores más elevados. En el caso de los composites C-3, tal y como se deduce de los valores de cristalinidad, los CNTs influyen como puntos de nucleación permitiendo la formación de cristales de mayor tamaño, y contribuyendo igualmente al desplazamiento de los valores de las T_m para estos composites a temperaturas más altas.

V-3.3.3. PROPIEDADES SUPERFICIALES

V-3.3.3.1. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

La morfología y rugosidad de las superficies también se analizó mediante microscopía de fuerza atómica. Tal y como se observó en las imágenes de microscopía electrónica de barrido, algunos composites presentan nanotubos de carbono en su superficie, y esto puede afectar su rugosidad. Las muestras tienen dos caras que, debido al método preparación, podrían presentar distintas características superficiales. Por ello, ambas caras se estudiaron mediante AFM. Las Figuras V-19 y V-20 muestran la

superficie de los materiales en contacto con el molde de vidrio y con el aire, respectivamente.

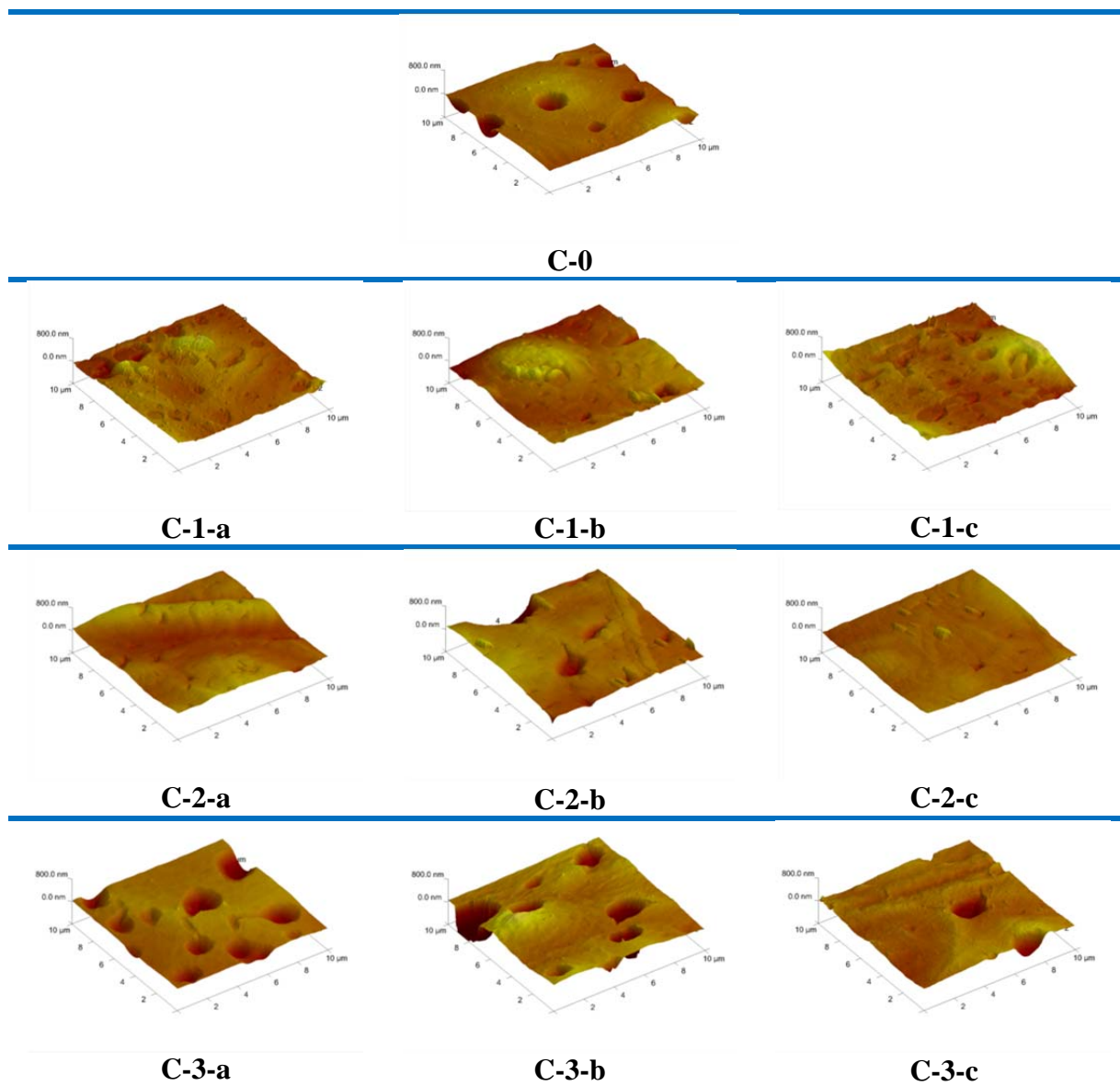


Figura V-19: Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la superficie en contacto con el molde de vidrio de los tres tipos de composites y la película de polímero usada como referencia.

Tal y como se observa en la Figura V-19, en todos los casos la película del polímero presenta poros en la superficie expuesta al aire, atribuidos a la evaporación del disolvente durante el proceso de formación de la película por el método de colada.⁸⁰ Las zonas sin poros muestran una superficie poco rugosa. Esta morfología, con poros homogéneamente distribuidos a lo largo de toda la superficie, sólo se observa en los composites C-3. Esto podría considerarse como la existencia de una mayor similitud

entre la evaporación de estas muestras y la utilizada como referencia. En el caso de los composites C-3, la adición de mayores cantidades de carga produce un incremento en la rugosidad dependiente de la cantidad de CNTs añadidos: $C-3-a < C-3-b < C-3-c$. A la vista de las imágenes de la Figura V-19 podría decirse que no existe variación apreciable en la rugosidad de los composites C-2 dependiente de la cantidad de carga añadida.

En el caso de las superficies de las muestras C-1 la variación en la rugosidad parece estar relacionada con la cantidad de nanocargas añadidas (ver Tabla V-5), indicativo de la mayor presencia de CNTs en esta superficie, tal y como se observó mediante microscopía electrónica de barrido (Figura V-6). Esta variación estaría de acuerdo con la segregación de los CNTs hacia el fondo de la dispersión durante la formación del composite, entrando en contacto con el molde de vidrio, probablemente como consecuencia de una pobre interacción con el polímero.

En la Figura V-20 se muestra la superficie de los composites en contacto con el aire durante el proceso de obtención, por lo que el factor más influyente en la configuración de la morfología superficial en esta cara es la interacción aire-disolución.

En la película de composite, C-0, se pueden observar grandes ondulaciones, sin la presencia de orificios o superficies planas. Al igual que para la superficie en contacto con el molde, sólo los composites C-3 presentan una morfología superficial similar a la muestra de referencia. El aumento de la cantidad de CNTs en el composite produce la aparición de una mayor cantidad de protuberancias en la superficie, posiblemente debido a la presencia de más CNTs próximos a la superficie, aunque recubiertos de polímero.

En las imágenes de la superficie de las muestras C-1 se observan grandes defectos, que pueden alcanzar un tamaño de varias micras, en una superficie rugosa. Sin embargo, la rugosidad superficial no parece ser ni homogénea, ni dependiente de la cantidad de CNTs añadidos, lo que estaría en concordancia con las imágenes de SEM (Figura V-16), donde la acumulación de las nanocargas se observó en la superficie en contacto con el molde de vidrio.

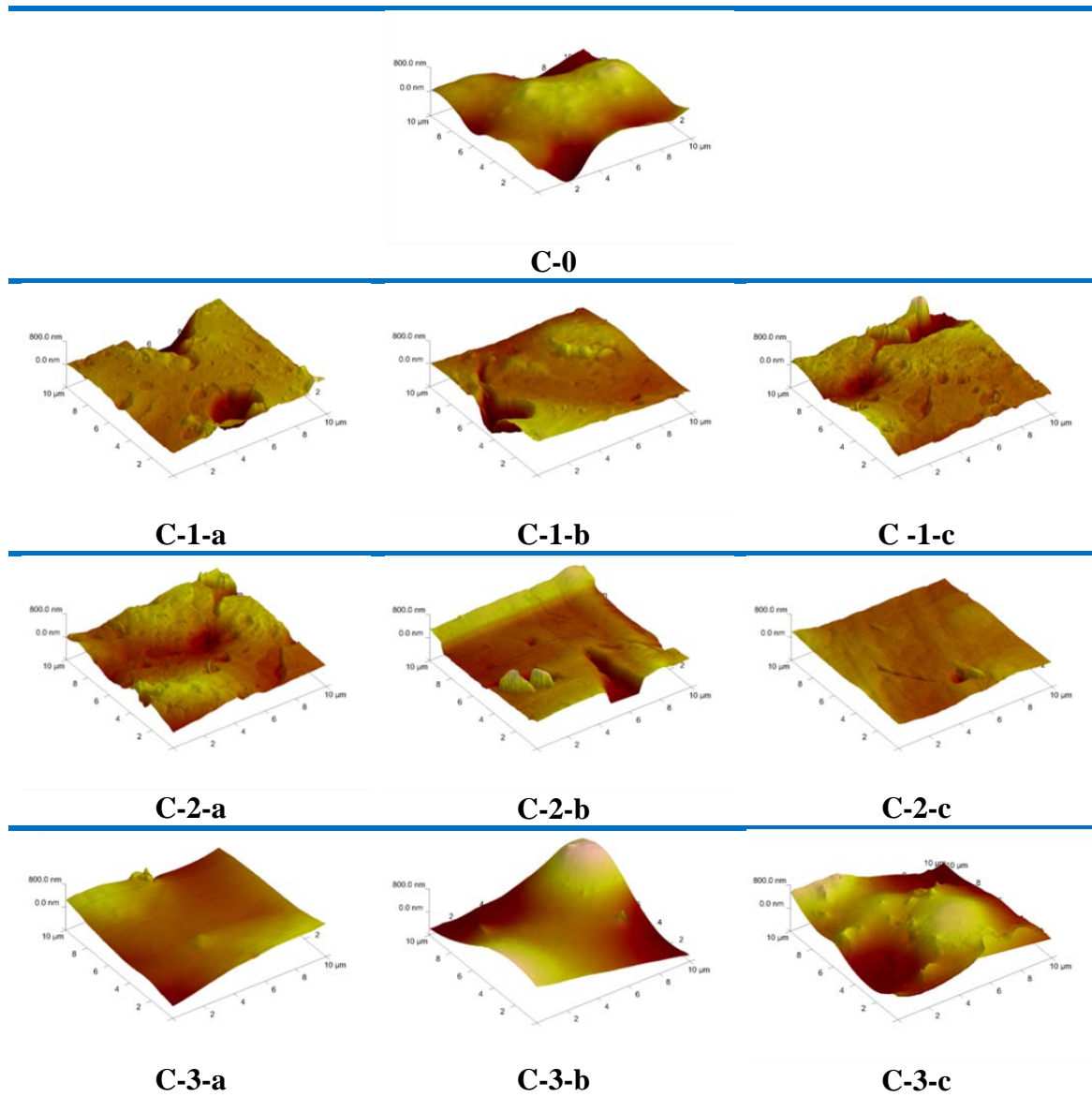


Figura V-20: Imágenes de microscopía de fuerza atómica de la superficie en contacto con el aire para los tres tipos de composites y la película de polímero usada como referencia.

Las imágenes de los composites C-2 muestran, en general, las superficies más lisas, con ausencia de defectos en las mismas, no observándose la influencia de las cargas en las superficies, lo que confirma las observaciones con SEM (Figura V-16), con las nanocargas aglomeradas en el interior de la matriz polimérica.

El estudio cuantitativo de la rugosidad superficial de las muestras en ambas caras se realizó mediante la medida de la rugosidad cuadrática media, R_q , de la rugosidad media, R_a , y de la rugosidad máxima, R_{max} , cuyos valores se muestran en la Tabla V-5.

Tabla V-5: Valores de rugosidad de los composites y la muestra de referencia, determinados a partir de las medidas de microscopía de fuerza atómica, para ambas caras.

Cara	Muestra	R_q (nm)	R_a (nm)	R_{max} (nm)
Molde	C-0	95 ± 5	72 ± 17	1257 ± 138
Molde	C-1-a	79 ± 8	58 ± 6	837 ± 183
	C-1-b	90 ± 12	71 ± 10	721 ± 117
	C-1-c	94 ± 9	71 ± 7	650 ± 30
Molde	C-2-a	87 ± 2	71 ± 3	434 ± 21
	C-2-b	115 ± 32	70 ± 21	933 ± 107
	C-2-c	37 ± 4	28 ± 4	411 ± 40
Molde	C-3-a	103 ± 8	70 ± 5	666 ± 38
	C-3-b	199 ± 46	119 ± 29	1378 ± 305
	C-3-c	111 ± 49	72 ± 29	859 ± 231
Aire	C-0	227 ± 17	182 ± 25	695 ± 65
Aire	C-1-a	185 ± 15	114 ± 20	1291 ± 139
	C-1-b	139 ± 27	93 ± 15	124 ± 78
	C-1-c	148 ± 32	109 ± 30	1212 ± 251
Aire	C-2-a	129 ± 9	103 ± 12	879 ± 159
	C-2-b	168 ± 10	133 ± 6	1276 ± 132
	C-2-c	56 ± 13	42 ± 12	522 ± 7
Aire	C-3-a	122 ± 13	98 ± 11	767 ± 69
	C-3-b	343 ± 47	279 ± 52	1915 ± 391
	C-3-c	241 ± 16	193 ± 16	1258 ± 5

En el caso de los composites con los nanotubos oxidados, C-2, y funcionalizados con P3HB3HHx de bajo peso molecular, C-3, no se observó una dependencia de la rugosidad (R_q , R_a y R_{max}) de la cara en contacto con el molde en función de la cantidad de carga añadida.

Sólo para los composites C-1 los valores de rugosidad permitieron determinar una tendencia dependiente de la cantidad de carga añadida. De este modo, se estimó un aumento de las variables de rugosidad, R_q y R_a , y una disminución de R_{max} , dependiente de la cantidad de CNTs añadida. Este comportamiento podría ser debido al incremento de CNTs en esta superficie al aumentar la cantidad adicionada, lo que produce un aumento de su rugosidad (incremento de R_q y R_a) y una mayor homogeneidad de la superficie (decremento de R_{max}) sin grandes defectos.

La medición de la rugosidad en la cara en contacto con el aire, con valores sin tendencias claras y de modo general superiores a los de la cara en contacto con el molde, pueden deberse a que el proceso de evaporación del disolvente es más rápido.

Los valores R_a y R_q del composite con el 1.2 % de fun-MWCNTs (C-3-c) son, de todos los composites, los más parecidos a la muestra de referencia. Así, se puede concluir que los composites con CNTs modificados con P3HB3HHx de bajo peso molecular en general y con el 1.2 % de CNTs en particular, en la cara en contacto con el molde presentan una morfología superficial muy similar al polímero de referencia, con unos valores de rugosidad parecidos.

V-3.3.3.2. MEDIDAS DE ÁNGULO DE CONTACTO

La interacción con la matriz extracelular y con las células se produce a través de la superficie de los materiales en un medio acuoso, hecho que determina la importancia de la humectabilidad de las superficies de los composites para explorar su futura aplicabilidad en la ingeniería tisular. Las Figuras V-21 y V-22, muestran los valores de ángulo de contacto para las dos caras de los composites, determinados mediante el método de la gota estática a temperatura ambiente, empleando agua desionizada.

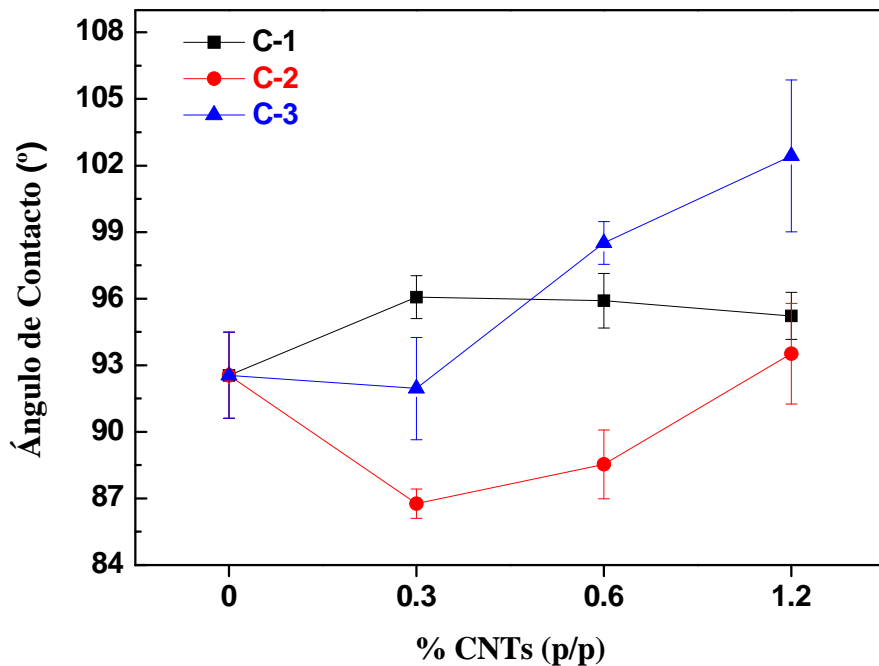


Figura V-21: Valores del ángulo de contacto de todos los composites y la muestra de referencia en la cara en contacto con el molde, determinados a partir de las mediciones mediante el método de la gota estática.

En los composites objeto de estudio hay dos factores que pueden afectar principalmente a la humectabilidad de las superficies, la composición química y su

rugosidad. En nuestro caso, las variaciones en la composición química sólo pueden producirse por la presencia o no de los CNTs en la superficie.

En la Figura V-21 se observan valores de ángulo de contacto para las muestras C-1 que son superiores al determinado para el polímero de referencia, con una ligera disminución de los mismos al añadir mayor cantidad de CNTs. Esta disminución podría atribuirse al incremento de la cantidad de nanotubos de carbono en la superficie, debido a que estos presentan mayor hidrofiliidad que el P3HB3HHx.⁹³

El comportamiento opuesto se observó para el resto de muestras. En el caso de los composites con los oxi-MWCNTs se produce una disminución del ángulo de contacto respecto al blanco para el composite con la menor cantidad de CNTs y un progresivo aumento de esta variable, llegando a un valor de ángulo de contacto comparable con el de la película de referencia (C-0), para el composite con la mayor concentración de CNTs. La disminución de la rugosidad, R_a , para superficies hidrofílicas según el modelo de Wenzel ($\theta < 90^\circ$), produce un aumento del ángulo de contacto,⁹⁴ tal y como se observa para los composites C-2.

De todos los tipos de muestras, el mayor aumento en el ángulo de contacto se observa en las muestras C-3. Teniendo en cuenta que no se observó una tendencia en ninguna de las variables de rugosidad medidas, no es posible ajustar la variación del ángulo de contacto a ningún modelo en función de dicha rugosidad. Sin embargo, para superficies rugosas microestructuradas, Cassie y Baxter⁹⁴ determinaron que existía un régimen heterogéneo de humectabilidad asociado a la rugosidad.⁹⁵ Si bien los composites no presentan superficies deliberadamente microestructuradas, la presencia de microporos ($\sim 2 \mu\text{m}$) podría contribuir a la formación espontánea de una superficie microestructurada. En las imágenes de microsocopia de fuerza atómica (Figura V-19) se observa una disminución del número de poros en la superficie del composite, pudiendo este hecho estar relacionado con el aumento de la hidrofobicidad de las superficies.

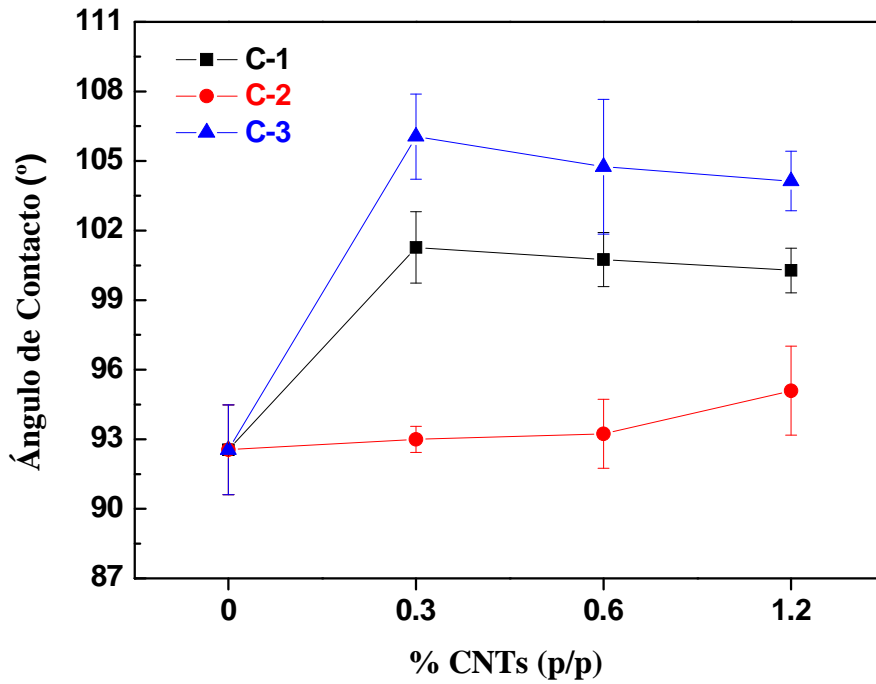


Figura V-22: Valores del ángulo de contacto de todos los composites y de la muestra de referencia en la cara expuesta al aire, determinados mediante el método de la gota estática.

Los valores de ángulo de contacto en la superficie expuesta al aire de todos los composites son superiores a los medidos en la muestra de referencia (Figura V-22).

Para los composites con pur-MWCNTs (C-1) y fun-MWCNTs (C-3) se observa una disminución de su ángulo de contacto a medida que aumenta la cantidad de CNTs añadida. Para el caso de los composites con oxi-MWCNTs (C-2), no se midió una variación del ángulo de contacto entre los distintos composites, con un valor muy similar al de la película de polímero empleada de referencia.

V-3.3.4. PROPIEDADES MECÁNICAS: ENSAYOS DE ESFUERZO-DEFORMACIÓN

La influencia de las nanocargas en matrices poliméricas ha sido ampliamente estudiada, encontrándose resultados contradictorios en algunos casos, no habiéndose demostrado, en general, una mejora de las propiedades mecánicas con un aumento en el porcentaje de carga en todas las matrices. Con objeto de establecer el efecto de los nanotubos de carbono en las propiedades mecánicas de los composites, se realizó un estudio mediante ensayos de esfuerzo-deformación (σ - ϵ).

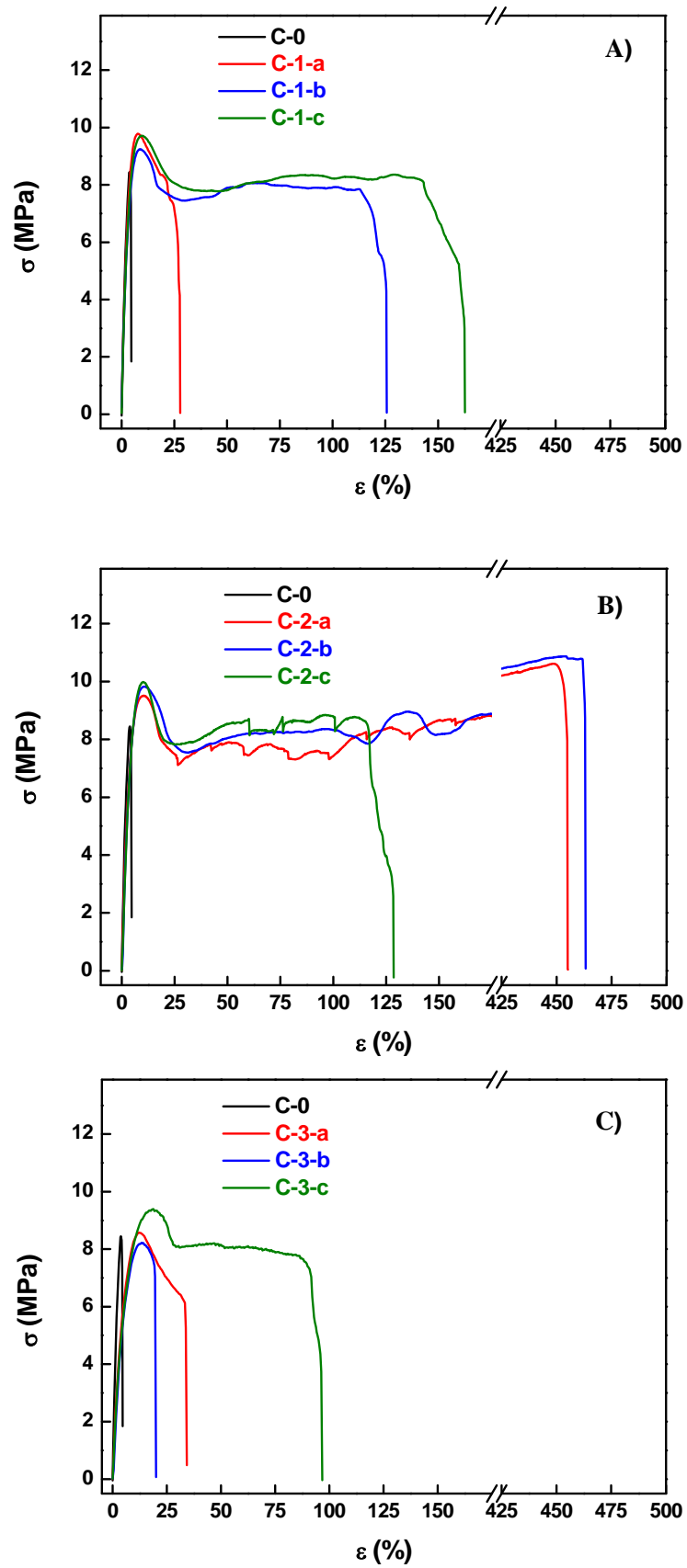


Figura V-23: Ensayos de esfuerzo deformación de A) composites con CNTs purificados B) composites con CNTs oxidados y C) composites con CNTs funcionalizados con PHDNF.

La Figura V-23 ilustra los resultados de los ensayos de esfuerzo-deformación para todos los composites preparados, medidos en probetas de 90-100 μm . Las probetas se troquelaron y ensayaron inmediatamente después del proceso de preparación y secado de los composites, con el propósito de evitar los posibles procesos de envejecimiento que pudieran influir en las propiedades mecánicas de las muestras.

A pesar de la variabilidad de comportamiento entre las probetas ensayadas para cada muestra, los resultados obtenidos para la mayoría de los composites presentan el comportamiento típico de los polímeros semicristalinos en los ensayos de esfuerzo-deformación (Figura V-23). Así, se observa una zona de deformación elástica, seguida de un punto de fluencia a partir del cual comienza a producirse la deformación plástica, zona donde estas probetas sufren la rotura. Sólo el composite con 0.6 % de fun-MWCNTs (C-3-b) presenta un comportamiento diferente, con una rotura en la zona elástica sin alcanzar el punto de fluencia.

La muestra de referencia C-0 no presenta el comportamiento típico, rompiendo antes de alcanzar el punto de fluencia, quizá debido a la degradación ocurrida durante su preparación. Es posible que la aplicación de ultrasonidos fragmente las cadenas del polímero.

Las diferencias de comportamiento entre los distintos composites se observan en la Tabla V-6, donde se muestran los valores del módulo elástico, E , esfuerzo máximo de tracción, $\sigma_{\text{máx}}$, esfuerzo en el punto de fluencia, σ_F , deformación en el punto de fluencia, ε_F , y rotura, ε_R , estimados a partir de estas curvas de esfuerzo-deformación.

A diferencia de lo observado para otros biopolímeros, como el quitosano,¹⁵ la adición de CNTs no produce un aumento del módulo de Young. Por el contrario todas las muestras presentan reducciones significativas de módulo de Young, con variaciones importantes en función del tipo de CNT, aunque no dependientes de la cantidad de nanocarga añadida.

El análisis de los resultados de la $\sigma_{\text{máx}}$ no muestra variabilidad de los resultados, con valores similares para los composites con respecto a la película de referencia.

Tabla V-6: Parámetros obtenidos de los ensayos σ - ε , para los tres distintos tipos de composites y la referencia.

Muestra	$\sigma_{m\acute{a}x}$ (MPa)	ε_R (%)	σ_F (MPa)	ε_F (%)	E (MPa)
C-0	9.7 ± 1.8	9.69 ± 7.52	-	-	255.9 ± 8.4
C-1-a	9.8 ± 0.2	30.0 ± 12.0	9.8 ± 0.2	7.8 ± 0.2	231.2 ± 7.2
C-1-b	8.8 ± 1.5	203.4 ± 190.9	8.8 ± 1.5	9.0 ± 0.2	222.9 ± 7.9
C-1-c	10.2 ± 0.6	171.3 ± 87.9	10.2 ± 0.6	8.5 ± 0.6	237.1 ± 16.8
C-2-a	11.2 ± 1.6	460.1 ± 104.5	9.7 ± 0.2	10.2 ± 0.3	199.6 ± 9.8
C-2-b	11.0 ± 1.2	333.8 ± 275.2	9.8 ± 0.1	10.4 ± 0.2	198.6 ± 7.7
C-2-c	10.0 ± 0.1	119.7 ± 31.0	10.0 ± 0.1	9.5 ± 0.8	188.3 ± 28.7
C-3-a	8.8 ± 0.5	37.2 ± 14.9	8.8 ± 0.5	6.1 ± 0.3	149.5 ± 7.5
C-3-b	8.4 ± 0.2	18.8 ± 4.2	-	-	130.3 ± 13.5
C-3-c	9.3 ± 0.1	80.4 ± 8.8	9.3 ± 0.1	17.9 ± 1.2	140.7 ± 2.0

El menor valor de la ε_R fue observado para la referencia, cuya curva esfuerzo-deformación se presenta en la Figura V-23, indicando la alta degradación (térmica y mecánica) sufrida por el polímero cuando fue sometido al tratamiento de obtención, especialmente por la aplicación de ultrasonidos, en ausencia de CNTs.

No se ha observado ninguna tendencia en los valores de la elongación máxima a rotura, ni en función de la cantidad ni del tipo de carga empleado para las muestras con pur-MWCNTs (C-1) y fun-MWCNTs (C-3), aunque ambos tipos de composites presentan valores superiores a los de la película empleada como referencia. Las muestras con oxi-MWCNTs (C-2) muestran una disminución progresiva de ε_R con el aumento de la cantidad de nanotubos de carbono añadida, pero con valores muy superiores a los de la muestra de referencia. Sin embargo, este comportamiento de la variable ε_R en las muestras con oxi-MWCNTs (C-2) debe ser tomado con mucha cautela, ya que la desviación estándar de la elongación máxima a rotura presenta valores muy elevados, 38-94 %. La variabilidad de estos resultados podría atribuirse a la heterogénea distribución de CNTs observada en estos dos tipos de composites (SEM, apartado V-3.3.1.1.). Esta heterogeneidad daría lugar a comportamientos muy diferentes entre probetas. A la vista de los resultados obtenidos, estos dos factores serían responsables de los altos valores de la desviación estándar. La variabilidad es menos marcada (entre 11-40 %) en los composites con fun-MWCNTs (C-3), lo cual puede indicar que, a pesar de la mejora de la interacción matriz-nanotubos de carbono y de la ausencia de aglomerados observada en estos composites (SEM, apartado V-3.3.1.), los

nanotubos de carbono también actúan como defectos en la matriz polimérica, aunque en mucha menor medida que los aglomerados.

La muestra de referencia, C-0, presenta un comportamiento más frágil y rígido que los composites, ya que su rotura se produce antes del punto de fluencia y su valor del módulo es el más alto. Este hecho está en concordancia con la disminución de la elongación máxima a rotura, asociada a la presencia de cadenas de menor tamaño, producidas durante el proceso de obtención de la muestra como consecuencia de la degradación ocurrida después de la aplicación de ultrasonidos.

En general, el mejor comportamiento mecánico observado para los composites podría indicar que durante el proceso de dispersión de los CNTs, con aplicación de ultrasonidos, los nanotubos de carbono absorben la mayor cantidad de la energía aplicada a la disolución disipándola en forma de calor dada su buena conductividad térmica.^{83,84,96} La ausencia de los mismos podría ser la causa de la pérdida de propiedades mecánicas del polímero constituyente de la matriz polimérica.

V-3.3.5. PROPIEDADES CONDUCTORAS; MEDIDAS DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

La estimulación eléctrica de materiales empleados para ingeniería tisular, se ha mostrado efectiva en la formación de tejido en terapias de medicina regenerativa. Especial interés tiene el uso de materiales conductores para favorecer el crecimiento neuronal, con lo que la medida de las propiedades eléctricas de los materiales obtenidos se revela como una característica importante a conocer. Por ello, se realizaron medidas de la conductividad eléctrica de todos los composites y el polímero de referencia. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura V-24. Todos los composites presentan valores de conductividad eléctrica medida a temperatura ambiente superior a la de la película de P3HB3HHx sin CNTs (C-0).

La referencia, C-0, y el composite con 0.3 % de oxi-MWCNTs (C-2-a), presentan el comportamiento típico de materiales desordenados, con valores de σ' incrementando con la frecuencia, variando despacio al principio y de modo más rápido posteriormente a altas frecuencias; esta variación sigue una ley exponencial con una variable muy cercana a 1.

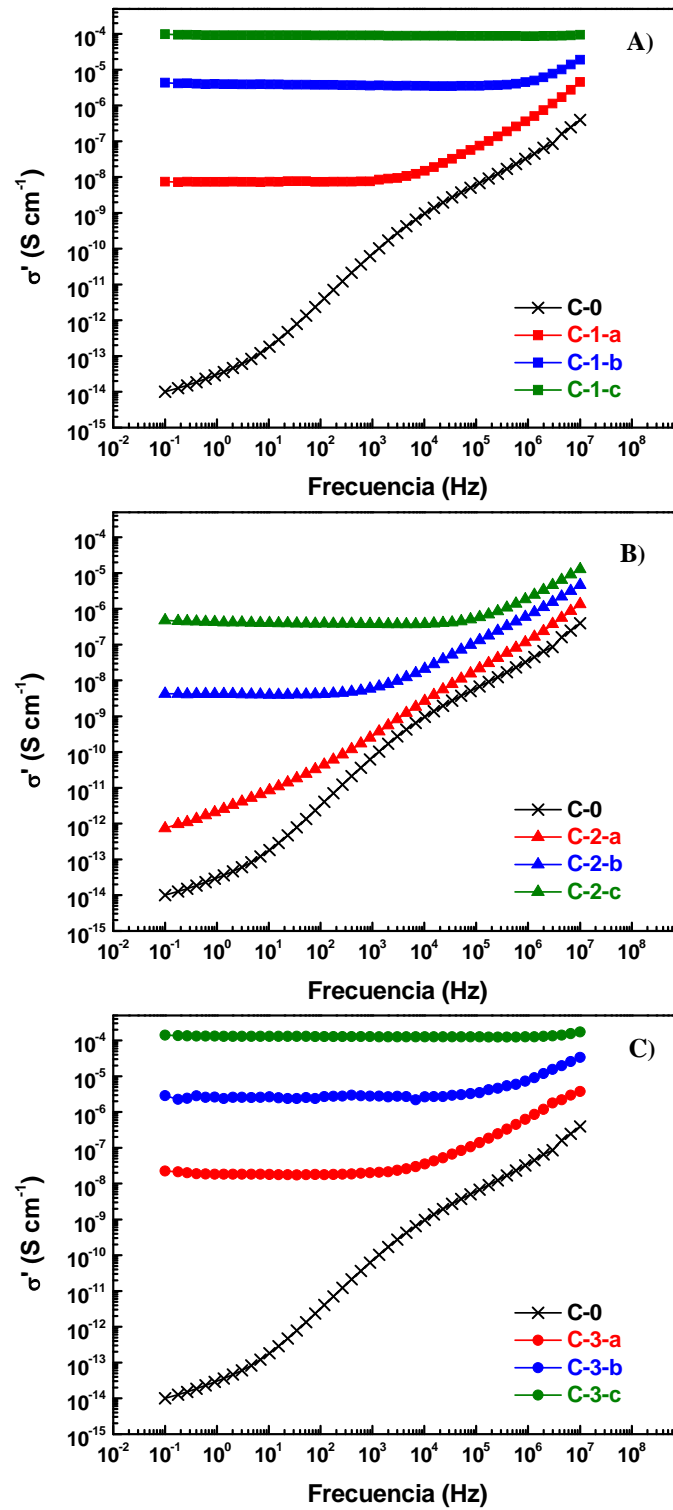


Figura V-24: Variación de la dependencia con la frecuencia de la parte real de la conductividad eléctrica compleja, $\log(\sigma')$ frente a $\log(f)$, comparando la muestras de referencia y A) composites C-1, B) composites C-2 y C) composites C-3.

Para el resto de composites, excepto para el composite con 1.2 % de pur-MWCNTs (C-1-c) y prácticamente para 1.2 % de fun-MWCNTs (C-3-c), las curvas de conductividad muestran un comportamiento diferente, con una región independiente de la frecuencia hasta una frecuencia característica, f_c , seguida de una región con un incremento de la conductividad con la frecuencia, $f < f_c$. Además, estos composites muestran valores de conductividad varios órdenes de magnitud superiores a la referencia, con incrementos dependientes la cantidad de nanocarga añadida, desplazándose f_c a valores más altos con el incremento de la nanocarga.

Las muestras con 1.2 % de pur-MWCNTs y 1.2 % de fun-MWCNTs (C-1-c y C-3-c, respectivamente) muestran los valores de conductividad más altos e independientes de la frecuencia en el rango estudiado.

El valor de la conductividad a la frecuencia más baja estudiada (10^{-1} Hz) se toma como la conductividad a corriente continua (σ_{DC}), y los valores se representan en la Tabla V-7 junto con el de la frecuencia crítica.

Tabla V-7: Valores de σ_{DC} en $S m^{-1}$ a la menor frecuencia estudiada (1×10^{-1} Hz) y los valores de la frecuencia crítica y la conductividad a la frecuencia crítica ($S m^{-1}$), $\sigma(f_c)$, para todas las muestras estudiadas y la de referencia.

Muestra	$\sigma_{DC} (S m^{-1})$	$f_c (Hz)$	$\sigma(f_c) (S m^{-1})$
C-0	1.0×10^{-12}	-	-
C-1-a	7.5×10^{-7}	2.0×10^3	9.0×10^{-7}
C-1-b	4.3×10^{-4}	5.9×10^5	4.1×10^{-4}
C-1-c	9.8×10^{-3}	-	-
C-2-a	7.4×10^{-11}	-	-
C-2-b	4.2×10^{-7}	4.0×10^2	5.9×10^{-7}
C-2-c	4.8×10^{-5}	7.7×10^4	5.1×10^{-5}
C-3-a	2.2×10^{-6}	3.0×10^3	2.4×10^{-6}
C-3-b	2.9×10^{-4}	1.2×10^5	3.7×10^{-4}
C-3-c	1.4×10^{-2}	-	-

Las muestras 0.6 y 1.2 % de pur-MWCNTs (C-1-b y C-1-c respectivamente), con 1.2 % de oxi-MWCNTs (C-2-c) y con 0.6 y 1.2 % de fun-MWCNTs (C-3-b y C-3-c respectivamente) presentan valores de conductividad eléctrica dentro del rango de la semiconductividad. Las muestras con 1.2 % de pur-MWCNTs (C-1-c) y 1.2 % de fun-MWCNTs (C-3-c) son semiconductoras en todo el rango de frecuencias medido, tal y

como se deduce del valor de la conductividad y de su comportamiento observado en la Tabla V-7 y Figura V-24.

En el caso del composite C-1-c la semiconductividad podría atribuirse a la formación de algún camino de conductividad a lo largo de la sección transversal del composite, producido por los escasos CNTs observados en la matriz polimérica; Mientras que en el caso de la muestra C-3-c este comportamiento es debido a una distribución homogénea de nanotubos de carbono bien dispersos en el interior de la matriz polimérica, obteniéndose un composite homogéneamente conductor.

V-3.4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD CON NEURONAS

La toxicidad de las nanocargas representa un inconveniente destacable en aplicaciones biológicas. Tal y como se ha indicado en el apartado V-1, la concentración de las cargas, su contacto con el medio celular y el grado de aglomeración, son factores importantes a tener en cuenta en la interacción del composite con las células y la matriz extracelular. Todos estos factores llevaron a la elección de la muestra con 1.2 % de fun-MWCNTs (C-3-c) para realizar el estudio de la citotoxicidad de los materiales. Esta muestra tiene la concentración de nanocargas más elevada de las empleadas en el estudio, pero presenta una buena distribución en la matriz polimérica y recubrimiento de las cargas. Estos hechos permiten una cesión lenta de las nanocargas al medio extracelular y protegen a las células del contacto directo con los CNTs. Además, la ausencia de aglomerados observada impediría su acumulación en el organismo, permitiendo su eliminación por los medios normales de excreción de residuos.

Las características superficiales, con una rugosidad ligeramente superior a la del polímero de partida podrían mejorar la interacción con las células; factor que se vería incrementado por la semiconductividad medida que puede contribuir a favorecer la interacción con las células neuronales.

La citocompatibilidad de los sustratos preparados se estudió en cultivos de neuroesferas de embrión de ratón, analizándose los resultados después de 48 h de sembrado mediante SEM, ensayo MTT y microscopía de fluorescente.

V-3.4.1. OBSERVACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La morfología celular sobre cualquier sustrato puede aportar información sobre la compatibilidad entre las células sembradas y dicho sustrato, siendo los cambios en la forma de las células y formación de filamentos (filopodia) indicativos de la afinidad de las células con el sustrato. La morfología de las neuroesferas sobre los sustratos preparados se estudió mediante microscopía electrónica de barrido, presentándose los resultados en la Figura V-25.

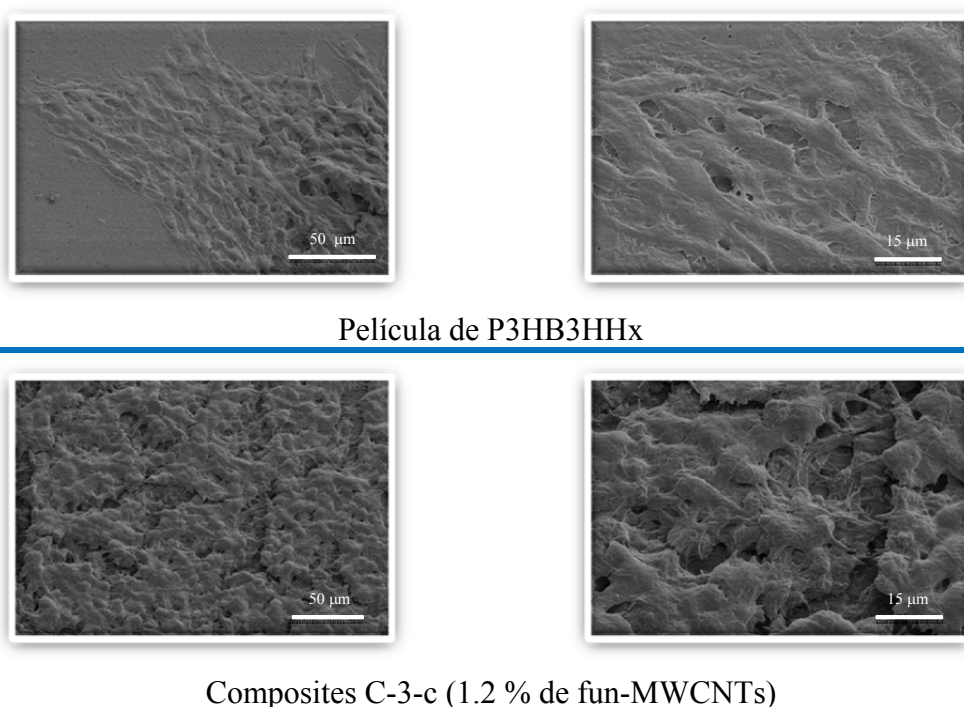


Figura V-25: Imágenes de microscopía electrónica de barrido a 500X (parte izquierda) y 1500X (parte derecha) de neuroesferas fluorescentes de embriones de ratón en el composite C-3-c y una película de P3HB3HHx empelada como referencia.

Las imágenes a 500X (Figura V-25, parte izquierda) muestran la alta densidad celular en el composite en relación a la muestra de referencia. Teniendo en cuenta que la observación se produjo a las 48 h después del sembrado, gran superficie de los sustratos no presentó células. No obstante, en la muestra C-3-c se observó mayor cantidad de acúmulos celulares y mayor densidad celular en la muestra de referencia.

Las imágenes a 1500X (Figura V-25, parte derecha) permiten observar con más detalle la morfología celular. Tal y como se aprecia en estas imágenes, las células

sembradas en el biocomposite con 1.2 % de fun-MWCNTs muestran un patrón de crecimiento tridimensional (3D), pudiéndose observar varias capas de células apiladas. En los sustratos de P3HB3HHx se observó una morfología celular más plana y un crecimiento bidimensional. Considerando que el modo usual de crecimiento de esta línea celular es en 3D, las imágenes parecen indicar una mayor afinidad de las neuroesferas por los biocomposites con CNTs.

V-3.4.2. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MTT

El ensayo de MTT permite comparar el crecimiento celular entre sustratos cuando el estudio se realiza con el mismo tipo de células y en el mismo experimento, minimizándose de este modo, la alta variabilidad asociada a los sistemas biológicos. Teniendo en cuenta que la reacción del reactivo MTT sólo se produce con las células vivas, el ensayo aporta información sobre la citotoxicidad del sustrato.

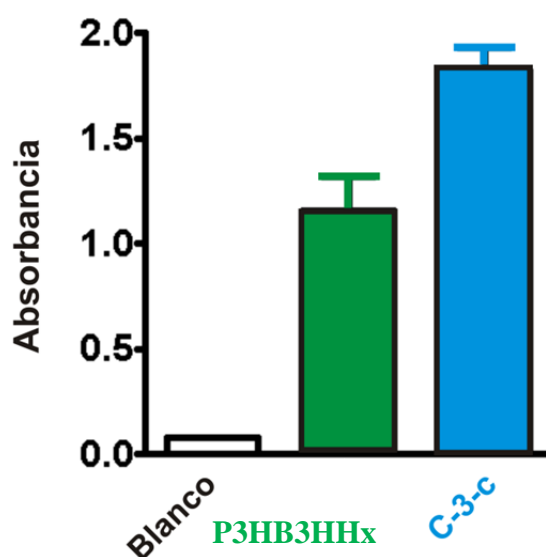


Figura V-26: Ensayo MTT de neuroesferas de embrión de ratón después de 48 h de sembrado sobre el composite C-3-c y P3HB3HHx empleado como referencia. El Blanco representa la señal de la placa de cultivo estándar empleada para colocar las muestras y sembrar las células.

Tal y como se observa en la Figura V-26, ambas muestras dieron señal de absorbancia en el ensayo de MTT, lo que indica la citocompatibilidad de ambas muestras con la línea celular empleada.

Del mismo modo que en el caso de las imágenes de SEM, la señal obtenida para el composite con 1.2 % de fun-MWCNTs (C-3-c) es mayor que para el P3HB3HHx empleado como referencia, indicando la mayor viabilidad del biocomposite semiconductor para el crecimiento de neuroesferas, quizá como consecuencia de la semiconductividad de este sustrato, debido a que las células neuronales incrementan su crecimiento sobre este tipo de sustratos.^{2,4,5}

V-3.4.3. OBSERVACIÓN CELULAR MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

El marcado fluorescente de las células permite realizar un seguimiento de su morfología a lo largo del tiempo de cultivo de las mismas, empleando microscopía confocal de fluorescencia. La Figura V-27 muestra las fotografías obtenidas a distintos tiempos del sustrato de P3HB3HHx, el composite C-3-c y una placa de PS con poli-L-Lisina empleada como control positivo.

En el caso del control, columna izquierda Figura V-27, se observa una adhesión de las neuroesferas a la placa tras 16 h, con un aumento progresivo de la superficie cubierta hasta las 48 h de finalización del estudio. Se aprecia como las neuroesferas modifican su morfología a medida que se extienden por la placa, presentando una morfología más plana.

Las imágenes de fluorescencia muestran la escasa adhesión de las neuroesferas por el sustrato sin CNTs, columna central, Figura V-27. Se observa como a lo largo del tiempo de estudio las neuroesferas no se adhieren al sustrato, manteniendo la morfología esférica.

Cuando el estudio se realizó con el composite C-3-c, columna derecha Figura V-27, después de 16 h es posible apreciar la adhesión de las neuroesferas al sustrato y la proliferación de las mismas, con el aumento de la superficie cubierta (esquina inferior izquierda de la imagen). Esta tendencia se mantiene durante el tiempo de estudio, con la adhesión y proliferación masiva de las neuroesferas, ocupando todo el campo visual observado. Esta muestra es la que presenta la mayor cantidad de células después de 48 h de todas las 3 estudiadas, posiblemente como consecuencia del favorecimiento del crecimiento neuronal producido por la semiconductividad del sustrato. Estos resultados confirman las observaciones mediante SEM y el resultado del ensayo de MTT.

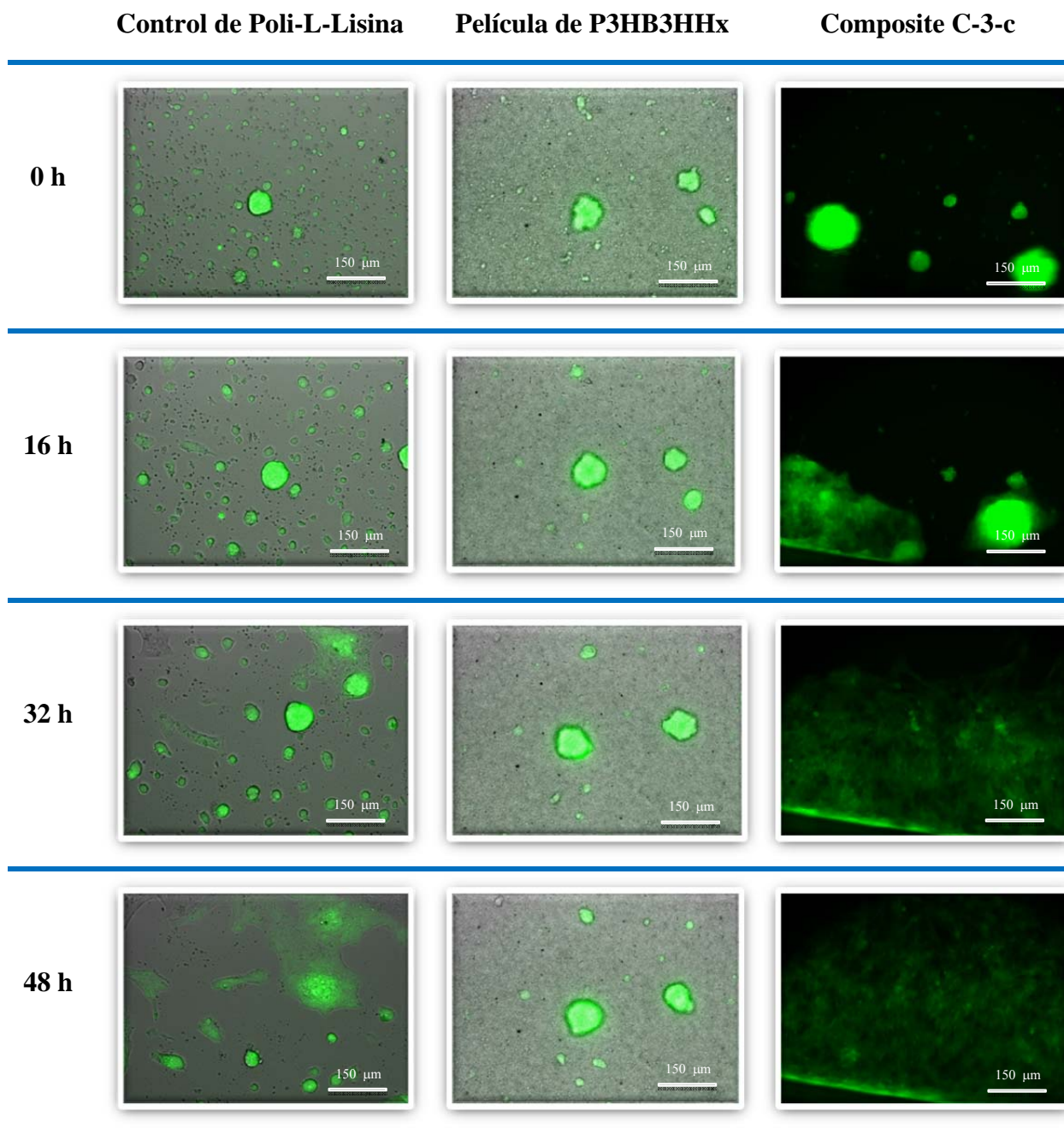


Figura V-27: Imágenes de microscopía de fluorescencia del sustrato polimérico de P3HB3HHx, del composite con 1.2 % de CNTs funcionalizados con P3HB3HHx de bajo peso molecular, C-3-c, y un control positivo de poli-L-Lisina.

Los resultados de SEM, el ensayo MTT y la microscopía de fluorescencia muestran la citocompatibilidad de los dos sustratos estudiados. Además, parecen indicar la mayor apetencia celular por los sustratos semiconductores, en los que se observa una gran adhesión y proliferación celular, con morfologías planas.

V-4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Broda, C. R.; Lee, J. Y.; Sirivisoot, S.; Schmidt, C. E.; Harrison, B. S. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2011**, 98 A, 509.
- (2) Schmidt, C. E.; Shastri, V. R.; Vacanti, J. P.; Langer, R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94, 8948.
- (3) Aebischer, P.; Valentini, R. F.; Dario, P.; Domenici, C.; Galletti, P. M. *Brain Research* **1987**, 436, 165.
- (4) Valentini, R. F.; Vargo, T. G.; Gardella Jr, J. A.; Aebischer, P. *Biomaterials* **1992**, 13, 183.
- (5) Valentini, R. F.; Sabatini, A. M.; Dario, P.; Aebischer, P. *Brain Research* **1989**, 480, 300.
- (6) Yang, M.; Zhu, S.; Chen, Y.; Chang, Z.; Chen, G.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. *Biomaterials* **2004**, 25, 1365.
- (7) Thuret, S.; Moon, L. D. F.; Gage, F. H. *Nature Reviews Neuroscience* **2006**, 7, 628.
- (8) Tysseling-Mattiace, V. M.; Sahni, V.; Niece, K. L.; Birch, D.; Czeisler, C.; Fehlings, M. G.; Stupp, S. I.; Kessler, J. A. *Journal of Neuroscience* **2008**, 28, 3814.
- (9) Xu, X. Y.; Li, X. T.; Peng, S. W.; Xiao, J. F.; Liu, C.; Fang, G.; Chen, K. C.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2010**, 31, 3967.
- (10) Wang, X.; Hu, W.; Cao, Y.; Yao, J.; Wu, J.; Gu, X. *Brain* **2005**, 128, 1897.
- (11) Ignatiadis, I. A.; Yiannakopoulos, C. K.; Barbitsioti, A. D.; Avram, A. M.; Patralexis, H. G.; Tsolakis, C. K.; Papalois, A. E.; Xenakis, T. H.; Beris, A. E.; Soucacos, P. N. *Microsurgery* **2007**, 27, 98.
- (12) Nakayama, K.; Takakuda, K.; Koyama, Y.; Itoh, S.; Wang, W.; Mukai, T.; Shirahama, N. *Artificial Organs* **2007**, 31, 500.
- (13) Schnell, E.; Klinkhammer, K.; Balzer, S.; Brook, G.; Klee, D.; Dalton, P.; Mey, J. *Biomaterials* **2007**, 28, 3012.
- (14) Iijima, S. *Nature* **1991**, 354, 56.
- (15) Harrison, B. S.; Atala, A. *Biomaterials* **2007**, 28, 344.
- (16) Journet, C.; Maser, W. K.; Bernier, P.; Loiseau, A.; Lamy de la Chapelle, M.; Lefrant, S.; Deniard, P.; Lee, R.; Fischer, J. E. *Nature* **1997**, 388, 756.
- (17) Thess, A.; Lee, R.; Nikolaev, P.; Dai, H.; Petit, P.; Robert, J.; Xu, C.; Lee, Y. H.; Kim, S. G.; Rinzler, A. G.; Colbert, D. T.; Scuseria, G. E.; Tománek, D.; Fischer, J. E.; Smalley, R. E. *Science* **1996**, 273, 483.
- (18) Cassell, A. M.; Raymakers, J. A.; Kong, J.; Dai, H. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, 6484.
- (19) Strong, K. L.; Anderson, D. P.; Lafdi, K.; Kuhn, J. N. *Carbon* **2003**, 41, 1477.
- (20) Chattopadhyay, D.; Galeska, I.; Papadimitrakopoulos, F. *Carbon* **2002**, 40, 985.
- (21) Andrews, R.; Jacques, D.; Qian, D.; Dickey, E. C. *Carbon* **2001**, 39, 1681.
- (22) Dillon, A. C.; Gennett, T.; Jones, K. M.; Alleman, J. L.; Parilla, P. A.; Heben, M. J. *Advanced Materials* **1999**, 11, 1354.
- (23) Martin, C. R.; Kohli, P. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, 2, 29.
- (24) Singh, R.; Pantarotto, D.; McCarthy, D.; Chaloin, O.; Hoebeke, J.; Partidos, C. D.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 4388.
- (25) Lovat, V.; Pantarotto, D.; Lagostena, L.; Cacciari, B.; Grandolfo, M.; Righi, M.; Spalluto, G.; Prato, M.; Ballerini, L. *Nano Letters* **2005**, 5, 1107.
- (26) Sitharaman, B.; Shi, X.; Tran, L. A.; Spicer, P. P.; Rusakova, I.; Wilson, L. J.; Mikos, A. G. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2007**, 18, 655.
- (27) Reynolds, C. H.; Annan, N.; Beshah, K.; Huber, J. H.; Shaber, S. H.; Lenkinski, R. E.; Wortman, J. A. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 8940.
- (28) Warheit, D. B.; Laurence, B. R.; Reed, K. L.; Roach, D. H.; Reynolds, G. A. M.; Webb, T. R. *Toxicological Sciences* **2004**, 77, 117.

- (29) Singh, R.; Pantarotto, D.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Klumpp, C.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 3357.
- (30) Abarrategi, A.; Gutiérrez, M. C.; Moreno-Vicente, C.; Hortigüela, M. J.; Ramos, V.; López-Lacomba, J. L.; Ferrer, M. L.; del Monte, F. *Biomaterials* **2008**, *29*, 94.
- (31) Belkas, J. S.; Shoichet, M. S.; Midha, R. *Neurological Research* **2004**, *26*, 151.
- (32) Wang, A.; Ao, Q.; Wei, Y.; Gong, K.; Liu, X.; Zhao, N.; Gong, Y.; Zhang, X. *Biotechnology Letters* **2007**, *29*, 1697.
- (33) Liu, B.; Cai, S. X.; Ma, K. W.; Xu, Z. L.; Dai, X. Z.; Yang, L.; Lin, C.; Fu, X. B.; Sung, K. P.; Li, X. K. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2008**, *19*, 1127.
- (34) Oh, S. H.; Kim, J. H.; Song, K. S.; Jeon, B. H.; Yoon, J. H.; Seo, T. B.; Namgung, U.; Lee, I. W.; Lee, J. H. *Biomaterials* **2008**, *29*, 1601.
- (35) Young, R. C.; Terenghi, G.; Wiberg, M. *British Journal of Plastic Surgery* **2002**, *55*, 235.
- (36) Mohanna, P. N.; Terenghi, G.; Wiberg, M. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery* **2005**, *39*, 129.
- (37) Chen, Y. S.; Chang, J. Y.; Cheng, C. Y.; Tsai, F. J.; Yao, C. H.; Liu, B. S. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3911.
- (38) Chen, M. H.; Chen, P. R.; Hsieh, S. T.; Huang, J. S.; Lin, F. H. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **2006**, *77*, 89.
- (39) Lu, M. C.; Hsiang, S. W.; Lai, T. Y.; Yao, C. H.; Lin, L. Y.; Chen, Y. S. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2007**, *18*, 843.
- (40) Kim, S. W.; Bae, H. K.; Nam, H. S.; Chung, D. J.; Choung, P. H. *Macromolecular Research* **2006**, *14*, 94.
- (41) Waitayawinyu, T.; Parisi, D. M.; Miller, B.; Luria, S.; Morton, H. J.; Chin, S. H.; Trumble, T. E. *Journal of Hand Surgery* **2007**, *32*, 1521.
- (42) Li, W.; Guo, Y.; Wang, H.; Shi, D.; Liang, C.; Ye, Z.; Qing, F.; Gong, J. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2008**, *19*, 847.
- (43) Wang, A.; Ao, Q.; Cao, W.; Yu, M.; He, Q.; Kong, L.; Zhang, L.; Gong, Y.; Zhang, X. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2006**, *79*, 36.
- (44) Zhang, P.; Xu, H.; Zhang, D.; Fu, Z.; Zhang, H.; Jiang, B. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*. **2006**, *34*, 89.
- (45) Lu, G.; Kong, L.; Sheng, B.; Wang, G.; Gong, Y.; Zhang, X. *European Polymer Journal* **2007**, *43*, 3807.
- (46) Uebersax, L.; Mattotti, M.; Papaloizos, M.; Merkle, H. P.; Gander, B.; Meinel, L. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4449.
- (47) Yang, Y.; Ding, F.; Wu, J.; Hu, W.; Liu, W.; Liu, J.; Gu, X. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5526.
- (48) Keilhoff, G.; Stang, F.; Wolf, G.; Fansa, H. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2779.
- (49) Huang, Y. C.; Huang, Y. Y. *Artificial Organs* **2006**, *30*, 514.
- (50) Reusch, R. N.; Sparrow, A. W.; Gardiner, J. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* **1992**, *1123*, 33.
- (51) Lee, S. Y. *Biotechnology and Bioengineering* **1996**, *49*, 1.
- (52) Wang, Y. W.; Yang, F.; Wu, Q.; Cheng, Y. C.; Yu, P. H. F.; Chen, J.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2005**, *26*, 755.
- (53) Qu, X. H.; Wu, Q.; Liang, J.; Zou, B.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2944.
- (54) Deng, Y.; Zhao, K.; Zhang, X. F.; Hu, P.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4049.
- (55) Wang, Y.; Bian, Y. Z.; Wu, Q.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2858.
- (56) Wang, Y. W.; Wu, Q.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2004**, *25*, 669.
- (57) Cheng, S.; Chen, G. Q.; Leski, M.; Zou, B.; Wang, Y.; Wu, Q. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3758.
- (58) Sun, J.; Dai, Z.; Zhao, Y.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2007**, *28*, 3896.
- (59) Xiao, X. Q.; Zhao, Y.; Chen, G. Q. *Biomaterials* **2007**, *28*, 3608.
- (60) Bian, Y. Z.; Wang, Y.; Aibaidoula, G.; Chen, G. Q.; Wu, Q. *Biomaterials* **2009**, *30*, 217.
- (61) Singh, C.; Shaffer, M. S. P.; Windle, A. H. *Carbon* **2003**, *41*, 359.

- (62) Verdejo, R.; Lamoriniere, S.; Cottam, B.; Bismarck, A.; Shaffer, M. *Chemical Communications* **2007**, 513.
- (63) Babinot, J.; Renard, E.; Langlois, V. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2011**, 212, 278.
- (64) Hou, P. X.; Liu, C.; Cheng, H. M. *Carbon* **2008**, 46, 2003.
- (65) Verdejo, R.; Stämpfli, R.; Alvarez-Lainez, M.; Mourad, S.; Rodriguez-Perez, M. A.; Brühwiler, P. A.; Shaffer, M. *Composites Science and Technology* **2009**, 69, 1564.
- (66) Bernal, M. M.; Liras, M.; Verdejo, R.; López-Manchado, M. A.; Quijada-Garrido, I.; París, R. *Polymer* **2011**, 52, 5739.
- (67) Organ, S. J.; Barham, P. J. *Journal of Materials Science* **1991**, 26, 1368.
- (68) Mei, N.; Zhou, P.; Pan, L. F.; Chen, G.; Wu, C. G.; Chen, X.; Shao, Z. Z.; Chen, G. Q. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2006**, 17, 749.
- (69) Nguyen, S.; Yu, G. E.; Marchessault, R. H. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 219.
- (70) Zhang, L.; Kiny, V. U.; Peng, H.; Zhu, J.; Lobo, R. F. M.; Margrave, J. L.; Khabashesku, V. N. *Chemistry of Materials* **2004**, 16, 2055.
- (71) Yang, H. X.; Sun, M.; Zhou, P. *Polymer* **2009**, 50, 1533.
- (72) Hu, Y.; Zhang, J.; Sato, H.; Futami, Y.; Noda, I.; Ozaki, Y. *Macromolecules* **2006**, 39, 3841.
- (73) Fogden, S.; Verdejo, R.; Cottam, B.; Shaffer, M. *Chemical Physics Letters* **2008**, 460, 162.
- (74) Pimenta, M. A.; Dresselhaus, G.; Dresselhaus, M. S.; Cançado, L. G.; Jorio, A.; Saito, R. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, 9, 1276.
- (75) Furukawa, T.; Sato, H.; Murakami, R.; Zhang, J.; Noda, I.; Ochiai, S.; Ozaki, Y. *Polymer* **2006**, 47, 3132.
- (76) Wróbel-Kwiatkowska, M.; Zuk, M.; Szopa, J.; Dymińska, L.; Maczka, M.; Hanuza, J. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2009**, 73, 286.
- (77) Datsyuk, V.; Kalyva, M.; Papagelis, K.; Parthenios, J.; Tasis, D.; Siokou, A.; Kallitsis, I.; Galiotis, C. *Carbon* **2008**, 46, 833.
- (78) Rasheed, A.; Dadmun, M. D.; Ivanov, I.; Britt, P. F.; Geohegan, D. B. *Chemistry of Materials* **2006**, 18, 3513.
- (79) Gao, C.; Jin, Y. Z.; Kong, H.; Whitby, R. L. D.; Acquah, S. F. A.; Chen, G. Y.; Qian, H.; Hartschuh, A.; Silva, S. R. P.; Henley, S.; Fearon, P.; Kroto, H. W.; Walton, D. R. M. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, 11925.
- (80) Li, J.; Yun, H.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2005**, 75, 985.
- (81) Okpalugo, T. I. T.; Papakonstantinou, P.; Murphy, H.; McLaughlin, J.; Brown, N. M. D. *Carbon* **2005**, 43, 153.
- (82) Webb, M. J.; Palmgren, P.; Pal, P.; Karis, O.; Grennberg, H. *Carbon* **2011**, 49, 3242.
- (83) Díez-Pascual, A. M.; Naffakh, M. *Carbon* **2012**, 50, 857.
- (84) Yang, Y. K.; Mao, L. P.; Zhou, X. P.; Xie, X. L.; Mai, Y. W. *Gaofenzi Cailiao Kexue Yu Gongcheng/Polymeric Materials Science and Engineering* **2005**, 21, 50.
- (85) Gunaratne, L. M. W. K.; Shanks, R. A. *European Polymer Journal* **2005**, 41, 2980.
- (86) Gunaratne, L. M. W. K.; Shanks, R. A. *Thermochimica Acta* **2005**, 430, 183.
- (87) Gunaratne, L. M. W. K.; Shanks, R. A.; Amarasinghe, G. *Thermochimica Acta* **2004**, 423, 127.
- (88) Hu, Y.; Zhang, J.; Sato, H.; Noda, I.; Ozaki, Y. *Polymer* **2007**, 48, 4777.
- (89) Rule, R. J.; Liggat, J. J. *Polymer* **1995**, 36, 3831.
- (90) Pearce, R.; Marchessault, R. H. *Polymer* **1994**, 35, 3990.
- (91) Jeon, I. Y.; Lee, H. J.; Choi, Y. S.; Tan, L. S.; Baek, J. B. *Macromolecules* **2008**, 41, 7423.
- (92) Doyle, C.; Tanner, E. T.; Bonfield, W. *Biomaterials* **1991**, 12, 841.
- (93) Pavese, M.; Musso, S.; Bianco, S.; Giorcelli, M.; Pugno, N. *Journal of Physics Condensed Matter* **2008**, 20.

- (94) Dorrer, C.; R  he, J. *Soft Matter* **2009**, 5, 51.
- (95) Cassie, A. B. D.; Baxter, S. *Transactions of the Faraday Society* **1944**, 40, 546.
- (96) Xie, X. L.; Mai, Y. W.; Zhou, X. P. *Materials Science and Engineering R: Reports* **2005**, 49.



VII-CONCLUSIONS/CONCLUSIONES

The research work showed in this Thesis have produced novel results which have been analyzed during the previous chapters. These novel results allowed to obtain specific conclusions, which main of them are related in this chapter. La investigación realizada a lo largo del presente trabajo de doctorado ha conducido a la obtención de novedosos resultados, analizados a lo largo de los capítulos previos. Las conclusiones más relevantes a las que han conducido dichos resultados se muestran en este capítulo.

The behaviour and applicability in regenerative therapies or tissue engineering of the copolymers of P3HAs used in this Research Report have been studied carefully during the previous chapters. The main conclusions, organized by chapters, are related below.

The study of *“Empleo de Copolímeros de P3HB3HV Para Regeneración de Tejido Urotelial”* using bidimensional substrates allows to conclude that:

1. The surface modification of P3HB3HV substrates obtained by aminolysis or by alkaline hydrolysis increases their wettability.
2. Amino, amide, alcohol and carboxylic groups were formed by chemical treatments, overcoming the problem of the lack of functionalities of P3HB3HV substrates.
3. Long treatment times with ED are required to facilitate the interaction between cells and polymer films, and NaOH treatments did not yield to a better result. Both long time chemical treatments, with ED and NaOH, decrease the molecular weight and mechanical properties of P3HB3HV copolymer. Consequently, chemical treatments alone are not appropriated for this application where good mechanical properties are required.
4. The YIGSR laminin fragment was effectively covalently attached to the films previously submitted to short time chemical treatment. These YIGSR modified substrates substantially improve interactions with urothelial cells in all experiments performed.

The use of the P3HB3HHx copolymer to obtain 2D substrates for urothelial regeneration in the chapter *“Empleo de Copolímeros de P3HB3HHx Para Regeneración de Tejido Urotelial”*, allows to compare their properties with those of P3HB3HV, concluding that:

1. The chemical treatment with NaOH does not reduce the contact angle but worsens the mechanical properties
2. The treatment of P3HB3HHx substrates with ED in aqueous medium renders the surface with active amino and amide groups, increasing the

wettability of the surface, without dramatic reduction of their mechanical properties.

3. Aminolysis treatment in alcoholic medium lead to a higher introduction of amino groups that in aqueous medium, but also produces a considerable reduction of mechanical properties with no increase in wettability of the substrates.
4. Short treatment times with ED in aqueous medium permit to covalently attach YIGSR laminin fragments, maintaining the good mechanical properties of the films.
5. The attachment of laminin fragment (YIGSR), improves the urothelial cell adhesion, proliferation and spreading on P3HB3HHx films surface, without a deterioration of the mechanical properties, allowing the use of these substrates for bladder repair or regeneration.

The use of 3D scaffolds of P3HB3HHx for tissue repair or regeneration was studied in the chapter *“Andamios Tridimensionales Para Regeneración de Tejido Urotelial”*, concluding that:

1. For the first time, 3D stable scaffolds of P3HB3HHx were obtained using the reproducible method of freeze-drying. The structure of the obtained scaffolds depends on 3HHx amount in the copolymer and on the amount of water employed.
2. ED treatments in isopropanol introduce new amino groups on the surface of the scaffolds depending on the treatment time. An increase in surface roughness, porosity and mean pore diameter is observed in all cases after chemical treatment.
3. In spite of the changes observed in the surface of the P3HB3HHx scaffolds after aminolysis, mechanical properties are scarcely affected, being the scaffolds able to be used in bladder repair or regeneration.
4. The amine groups formed after ED treatment allows attaching YIGSR laminin fragments, and Cys-Laminin A chain, onto the substrates. Then an increment in mean pore diameter and moduli comparing with the ED treated scaffolds is observed.

5. PHBHHx copolymers are citocompatible with human urothelial cancer cells RT 112. YIGSR fragment increase RT 112 cells growth on PHB14%HHx scaffolds, but Cys-Laminin A Chain reduce the cells growth compared with pristine PHB14%HHx scaffold.

The versatility of P3HAs to be used in the regeneration of different type of tissue was explored for bone repair, “*Composites de P3HAs Para Regeneración Ósea*”, and the main conclusions obtained are:

1. SEM examination confirms that a homogeneous distribution of filler particles is obtained at low volume fractions. The extent of agglomerates, voids and particle deposition at the bottom of the films increased with filler amount and are visible at medium and higher volume fractions.
2. The complex thermal study of the composites shows a partial encapsulation of CaSO_4 for some of the copolymers, with a general reduction in crystallinity of the HHx copolymers as consequence of the fillers addition. This variation on the behavior could be used as tool to control the *in vitro* and *in vivo* degradation rate of the materials.
3. DMTA results suggest that several factors contributed to the damping of the composites, such as particle-particle agglomeration, with the consequence of a drastic reduction in moduli of biocomposites.
4. The filler addition contribute to the reduction of the hydrophobicity of the composites, which suggest that would be possible a better interaction of the composites with extracellular matrix environment, favoring the adhesion, proliferation and spreading of osteoblast cells.
5. The most bioactive composites *in vitro* were PHBHV-c and PHB14%HH-c (both with highest amount of fillers), which after only 7 days after immersion in SBF showed the formation of HA on the surface. The control of HA formation depending on time of immersion in SBF is achieved for P3HB3HHx copolymers.

The use of P3HB3HHx copolymer with 14% by mol of 3HHx in neuronal growth was explored in “*Composites Semiconductores Para Terapias Regenerativas*”. This novel work provides interesting conclusions related below:

1. By the proposed methodology purified, oxidized and functionalized CNTs with low molecular weight P3HBHHx were obtained.
2. The surface functionalization of MWCNTs with low molecular weight P3HB3HHx (fun-MWCNTs), increased the interaction with the polymer matrix in composites, providing good distributed not agglomerated fun-MWCNTs. This good distribution caused the increase of crystallinity of the composites, because the fun-MWCNTs would act as a new crystals growth site.
3. Thermal and mechanical properties were affected by CNTs addition, increasing the combustion and melting temperatures and the elongation to break of composites compared with pristine polymer.
4. The real part of complex conductivity of composites depends on the amount of CNTs added, obtaining semiconductive composites in all the range of frequencies measured, for bionanocomposites with 1.2 % of purified MWCNTs and 1.2 % of oxi-MWCNTS or fun-MWCNTs.
5. Cell viability studies carried out with neurospheres indicate that sample with 1.2 % of fun-MWCNTs is not cytotoxic. Even more, the semiconductive character of this bionanocomposite favours the neurospheres growth on its surface, increasing the amount of cells compared with pristine polymer and a reference sample seeded on a polystyrene plate with poly-L-Lysine. For this reason, bionanocomposites of P3HB3HHx and fun-MWCNTs are promising substrates for the regeneration of nervous cells.

A lo largo del presente doctorado se ha estudiado de modo cuidadoso el comportamiento y aplicabilidad de los diferentes copolímeros de P3Has en terapias regenerativas o de ingeniería tisular. Las más importantes y relevantes conclusiones se exponen a continuación.

El estudio de ***“Empleo de Copolímeros de P3HB3HV Para Regeneración de Tejido Urotelial”*** mediante el uso de sustratos bidimensionales permitió concluir que:

1. Se produce un aumento de la mojabilidad de las superficies de P3HB3HV tratadas con etilendiamina o hidróxido sódico.
2. Mediante tratamientos químicos se introdujeron grupos funcionales, amino, amida, alcohol y carboxilo, resolviendo así la falta de grupos funcionales reactivos en los sustratos de P3HB3HV. Los tratamientos con NaOH no proporcionaron una mejora en la interacción células-sustrato, mientras que tratamientos a tiempos largos con ED incrementan dicha interacción. Ambos tratamientos, con NaOH o ED, durante tiempos largos producen una disminución del peso molecular del P3HB3HV, viéndose afectadas sus propiedades mecánicas. En consecuencia, los tratamientos químicos aislados no son apropiados para aplicaciones en los que se necesiten buenas propiedades mecánicas.
3. El procedimiento empleado permitió unir de modo covalente y efectivo el fragmento peptídico de laminina YIGSR en sustratos tratados durante tiempos cortos. Este fragmento incrementó la interacción células-sustrato en todos los experimentos realizados.

En el capítulo ***“Empleo de Copolímeros de P3HB3HHx Para Regeneración de Tejido Urotelial”***, se estudió el uso de sustratos 2D de P3HB3HHx, lo que permitió comparar sus propiedades con el P3HB3HV, concluyéndose que:

1. El tratamiento con NaOH no produce un aumento de la humectabilidad mientras que empeora las propiedades mecánicas.
2. Cuando los sustratos se trataron con ED en medio acuoso, se introdujeron en las superficies tratadas grupos amino y amida, aumentando la mojabilidad, y sin producir una reducción drástica en las propiedades mecánicas de los sustratos.

3. El tratamiento con ED en medio alcohólico es más efectivo que en medio acuoso, proporcionando más grupos funcionales en las superficies de los sustratos, pero produciendo igualmente una mayor pérdida de propiedades mecánicas sin un apreciable aumento de la mojabilidad.
4. Para la unión covalente del fragmento YIGSR son necesarios solamente tratamientos cortos con ED en medio acuoso, manteniendo las buenas propiedades mecánicas de las películas.
5. La unión del fragmento YIGSR incrementa la adhesión, proliferación y expansión de las células uroteliales sobre las superficies de los sustratos de P3HB3HHx. Este proceso no produce una degradación mecánica, permitiendo el uso de estos sustratos para la regeneración o reparación de la vejiga.

El empleo de sustratos 3D de P3HB3HHx para reparación o regeneración de tejidos también se estudió en el capítulo ***“Andamios Tridimensionales Para Regeneración de Tejido Urotelial”***, concluyéndose que:

1. Por primera vez se han obtenido andamios 3D estables dimensionalmente de copolímeros de P3HB3HHx utilizando el método de emulsión-liofilización. La estructura de los andamios obtenidos depende de la cantidad de 3HHx en el copolímero y de la cantidad de agua empleada.
2. Tratamientos con ED en medio alcohólico (isopropanol) introducen nuevos grupos funcionales amino en las superficies de los andamios, cuya cantidad depende del tiempo de tratamiento. Este procedimiento incrementa la rugosidad de las superficies, la porosidad y el diámetro de poro medio en todos los casos.
3. A pesar de los cambios observados en la superficie de los andamios de P3HB3HHxs producidos por la aminólisis, los ensayos mecánicos mostraron una escasa degradación mecánica de los andamios, lo que permitiría el uso de estos sustratos para regeneración o reparación de vejiga.
4. Los nuevos grupos amino permiten unir covalentemente los dos fragmentos peptídicos empleados, YIGSR y cadena de Cis-Laminina A.

De esta forma, se observó un incremento en el tamaño medio de poro y en el módulos en comparación con los correspondientes sustratos tratados sólo con ED.

5. Los copolímeros de P3HB3HHx, son citocompatibles con células cancerígenas humanas de urotelio RT 112. Mientras que el fragmento YIGSR aumenta el crecimiento de estas células en los andamios de PHB14%HHx, la cadena A de Cis-Laminina reduce el crecimiento celular comparado con el PHB14%HHx sin tratamiento.

La versatilidad de los P3HAs usados en la regeneración de distintos tipos de tejidos se exploró para la reparación de hueso, ***“Composites de P3HAs Para Regeneración Ósea”***, y las principales conclusiones obtenidas son:

1. La observación mediante SEM de las muestras confirmó la distribución homogénea de las partículas cuando se adicionan pequeñas cantidades de carga. Para las muestras con proporciones de carga media y alta se observaron aglomerados, orificios y deposición de partículas en la parte inferior del sustrato.
2. Mediante el estudio de las propiedades térmicas se determinó un encapsulamiento parcial del CaSO_4 para algunos copolímeros, con una reducción general de la cristalinidad de los copolímeros de 3HHx como consecuencia de la adición de las cargas. Esta variación en el comportamiento térmico podría ser empleada como herramienta para controlar la velocidad de degradación *in vitro* o *in vivo* de los materiales.
3. El estudio de las propiedades mecánicas mediante DMTA sugiere que existen numerosos factores que afectan a la capacidad de amortiguamiento de los composites, como la aglomeración partícula-partícula, con la consecuencia de una reducción drástica del módulo de los composites.
4. La reducción de la hidrofobicidad determinada en los composites como consecuencia de la adición de las partículas a la matriz polimérica, podría indicar que presentarían una mejora en la interacción con la matriz extracelular, favoreciendo la adhesión, proliferación y extensión de los osteoblastos.

5. Los estudios *in vitro* determinaron que en la superficie de los composites PHBHV-c y PHB14%HH-c se forma HA tras 7 días de inmersión en SBF, siendo estas muestras las mas bioactivas. Además, la formación de HA en función del tiempo de inmersión in SBF se puede controlar para los copolímeros de P3HB3HHx.

El empleo del P3HB3HHx con un 14% molar de 3HHs en crecimiento neuronal se estudió en “**Composites Semiconductores Para Terapias Regenerativas**”. Este novedoso trabajo arrojó interesantes conclusiones que se exponen a continuación:

1. Mediante la metodología propuesta en el trabajo se obtuvieron y caracterizaron de modo correcto los CNTs purificados, oxidados y funcionalizados con P3HB3HHx de bajo peso molecular.
2. La funcionalización de los MWCNTs con P3HB3HHx de bajo peso molecular (fun-MWCNTs) incrementa su interacción con la matriz polimérica, dando lugar a composites con MWCNTs no aglomerados bien distribuidos. En estos composites se produce un incremento de la cristalinidad, atribuible a que los fun-MWCNTs pueden actuar como nuevos puntos de cristalización.
3. Las propiedades mecánicas y térmicas del polímero se ven afectadas en función de la cantidad de CNTs incorporados, incrementando la temperatura de combustión y la de fusión y la elongación a rotura en comparación con el polímero sin cargas.
4. La conductividad real de los composites depende de la cantidad de nanocarga añadida, obteniéndose composites semiconductores en todo el rango de frecuencias medido para los bionanocomposites con un 1.2 % de MWCNTs purificados y fun-(MWCNTs).
5. Los estudios con neuroesferas fluorescentes muestran que la muestra con 1.2 % de fun-MWCNTs no es citotóxica. Además, el carácter semiconductor de este bionanocomposite favorece el crecimiento de las neuroesferas en su superficie, incrementando la cantidad de células comparativamente con el polímero sin carga y con una placa de poli-L-lisina, empleadas como referencia. Por esta razón, los bionanocomposites

de P3HB3HHx y fun-MWCNTs son sustratos prometedores para la regeneración de células nerviosas.